Neue Erkenntnisse über das natürliche Vorkommen von Vitamin C, über die Haltbarkeit der Ascorbinsäure sowie deren Verhalten gegenüber anderen Vitaminen, Silbernitrat und Oxydationsfermenten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt a. M.

vorgelegt von

Willi Rudolph

aus Frankfurt a. M.-Höchst

Frankfurt a. M. 1937

Dissertationsdruckerei F. W. Kalbfleisch, Gelnhausen

Referent: Dr. phil. habil. R. Strohecker.

Korreferent: Professor Dr. H. Dieterle.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juni 1937.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern
in Dankbarkeit!

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 5

I. Der Gehalt an Ascorbinsäure in Blättern in Abhängigkeit von Jahreszeit und Witterung
a) Allgemeines 6
b) Arbeitsweise 6
Tabelle I. Untersuchung von Birkenblättern . . . 8
Tabelle II. Untersuchung von Walnußblättern . . . 12
Tabelle III. Untersuchung von Johannisbeerblättern . . 14

II. Die Einwirkung von Vitamin C auf Silbernitrat
a) Das mikroskopische Bild 17
b) Einwirkung reiner Ascorbinsäure auf Silbernitrat . . 18
c) Einfluß der p_H-Stufe 20
d) Einfluß des Lichtes 21
e) Einfluß der Temperatur 21
f) Einfluß der Zeit 22
g) Einwirkung von gepufferten Blattauszügen und Fruchtsäften auf Silbernitrat 23
h) Einwirkung von sauren Fruchtsäften auf Silbernitrat . . 24

III. Versuche zur Reindarstellung von Vitamin C aus Birkenblättern 25

IV. Ueber die Haltbarkeit von Vitamin C
a) Schützender Einfluß von Blattgewebe auf das Reduktionsvermögen von Blattauszügen 27
b) Schützender Einfluß von Blattgewebe auf wässrige Ascorbinsäurelösungen 29
c) Haltbarkeit wässriger Lösungen von reiner Ascorbinsäure 30
d) Einfluß von Eiweiß und Aminosäuren auf die Haltbarkeit wässriger Ascorbinsäurelösungen 31
e) Leitfähigkeit und Oxydation wässriger Ascorbinsäurelösungen 31

V. Ueber die Einwirkung der Oxydationsfermente auf Vitamin C
A. Oxydasen
a) Allgemeines 32
b) Nachweis von Monophenolase (Tyrosinase) . . 34
c) Nachweis von Polyphenolase 34
d) Einwirkung der Oxydasen auf Ascorbinsäure . . 35
B. Peroxydase
a) Nachweis und Hemmung der Peroxydase . . 37
b) Einwirkung von Peroxydase + Wasserstoffperoxyd auf Ascorbinsäure 38

VI. Wechselwirkungen zwischen Vitamin C und anderen Vitaminen 39

Zusammenfassung 41

Schriftennachweis 42

Einleitung.

Die Erfassung des Vitamin C-Gehaltes in pflanzlichen Produkten mittels 2,6-Dichlorphenolindophenol nach J. Tillmans (1) konnte von H. Henke (2) u. a. für verschiedene Blätter durch den Tierversuch bestätigt werden. Das hierbei gefundene verhältnismäßig hohe Reduktionsvermögen der Birkenblätter wurde von H. Henke während einer ganzen Vegetationsperiode verfolgt, wobei sich eine gewisse Abhängigkeit des Vitamingehaltes von Jahreszeit und Witterung feststellen ließ.

Es war nun von Interesse, andere nach Einzelbestimmungen ebenfalls durch einen hohen Vitamin C-Gehalt ausgezeichnete Blätter in der gleichen Weise zu untersuchen und daneben noch die absolute Menge Ascorbinsäure in der Blattrockensubstanz festzustellen.

Sodann waren die Henke schen Versuche über das Verhalten der Ascorbinsäure gegenüber Silbernitrat fortzuführen und diese Reaktion wenn möglich quantitativ festzulegen.

Ferner interessierte im Zusammenhang mit Versuchen von E. Gugath (3) das Verhalten von Ascorbinsäure in wässriger Lösung, sowie die Einwirkung zusätzlicher Reagenzien auf ihre Haltbarkeit.

Aus den Versuchen zur Reindarstellung von Vitamin C aus Birkenblättern, die schon mehrfach vergeblich versucht worden war und wieder aufgenommen wurde, ergab sich ein weiteres interessantes Arbeitsgebiet: der Einfluß der Oxydationsfermente auf das Reduktionsvermögen der Ascorbinsäure.

Im Zusammenhang mit den Versuchen über die Haltbarkeit und Oxydation des Vitamins C in wässriger Lösung stand eine Beobachtung von medizinischer Seite, wonach die Vitamine A und D die antiskorbutische Wirksamkeit des Vitamins C im Organismus aufzuheben vermögen. Es war nun festzustellen, ob dieser hemmende Einfluß der Vitamine aufeinander auch außerhalb des Organismus' in Erscheinung treten würde.

I. Der Gehalt an Ascorbinsäure in Blättern in Abhängigkeit von Jahreszeit und Witterung

a) Allgemeines.

Wie schon in der Einleitung angedeutet, ist nach Versuchen von H. Henke (2) der Gehalt an Vitamin C in Birkenblättern in der Zeit vom Frühjahr bis zum Herbst durch Anstieg und Abfall bestimmt und dabei erheblichen Schwankungen unterworfen. Er ist abhängig von der jeweiligen Größe und Beschaffenheit der Blätter, ändert sich also mit der Jahreszeit; daneben zeigte sich, wenn auch weniger abgestuft, eine gewisse Abhängigkeit von der Witterung.

Ich habe diese Versuche fortgesetzt und neben Birkenblättern noch die Blätter der Walnuß und Johannisbeere von der Knospe bis zum abgefallenen Blatt laufend untersucht. Von Interesse waren besonders die Walnußblätter, die nach Einzelbestimmungen von H. Henke den Gehalt der Birkenblätter an Ascorbinsäure noch weit übertroffen hatten. Die Blätter der Johannisbeere hatten in früheren Einzelbestimmungen ebenfalls eln hohes Reduktionsvermögen gezeigt.

Neben der Titration von Auszügen frischer Blätter zur Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes wurde nun auch fortlaufend der Wassergehalt der verschiedenen verwendeten Blattsorten und -größen bestimmt, um einen Einblick in das Verhältnis der Menge Trockensubstanz zum Vitamingehalt und damit die Größe der absoluten Ascorbinsäuremengen zu erhalten.

b) Arbeitsweise.

Das Blattmaterial, welches im Laufe des Jahres zur Verwendung kam, wurde immer demselben Baum bzw. Strauch entnommen. Von den Blättern, bzw. Knospen und Früchten wurden jeweils diejenigen zur Untersuchung ausgelesen, die dem augenblicklichen Allgemeinstand des Gewächses entsprachen, ungewöhnliches großes oder kleines Material ausgeschieden und verletzte Stücke nicht verwendet. Bei den geschlossenen Blattknospen wurden vor der Einwage die äußeren Hüllblätter entfernt, bei den folgenden Blättern — entsprechend dem Knospeninhalt — die Blattstiele mitverarbeitet. Das gesamte Untersuchungsmaterial wurde morgens gesammelt und sofort ausgewertet.

Zur Untersuchung auf den Vitamingehalt wurden etwa 5,00 g der Blätter abgewogen, mit einem rostfreien Messer gut zerkleinert und in einem Rundkolben zu etwa 80 ccm 0,2%iger Essigsäure gegeben. Nun wurde die Luft des Kolbens durch kurzes Einleiten von Stickstoff verdrängt, um eine Oxydation zu vermeiden, und dann unter weiterer Stickstoffzufuhr die Flüssigkeit 10 Minuten am Rückflußkühler kräftig gekocht. Dann wurde, ebenfalls unter Stickstoffzufuhr, mit Eis gekühlt, die Blattreste schnell abfiltriert und in

einem Tuch ausgepreßt. Das Filtrat wurde nun mit 0,2%iger Essigsäure auf 100 ccm aufgefüllt, hiervon ein aliquoter Teil, meist 20 ccm, abpipettiert und mit einer n/1000 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung nach J. Tillmans (1) titriert.

Bei Auszügen von Blättern der Birke und Johannisbeere erwies sich wegen ihrer nur geringen Eigenfärbung als zweckmäßig, die schwach sauren Lösungen mit etwas Natriumacetat zu puffern und auf einen blau-grünen Farbton zur titrieren, da dieser wesentlich schärfer zu erkennen war als der rote Farbton, der am Ende der Titration in saurer Lösung auftritt. Die intensiv gelb gefärbten Auszüge der jungen Walnußblätter wurden dagegen vor Beginn der Titration mit 1 ccm Nitrobenzol versetzt und gegen eine Vergleichslösung aus Wasser und Nitrobenzol auf einen rötlich-braunen Ton des Nitrobenzols titriert. Die Auszüge der älteren Walnußblätter besaßen nicht mehr die intensiven Färbungen und konnten ebenfalls sehr gut mit Hilfe der Acetatpufferung titriert werden. Als Titrationsgefäße erwiesen sich solche von hoher und schmaler Form am geeignetsten, weil dadurch bei verhältnismäßig geringer Substanzmenge eine dicke Flüssigkeitsschicht vorlag, die die Färbung leichter erkennen ließ.

Daneben wurden vom gleichen feingeschnittenen Material 2 g genau im Wägegläschen eingewogen und 4 Stunden im Trockenschrank bei 103 bis 105° getrocknet. Die Rückwägung ergab den Gehalt an Trockensubstanz. Hieraus ließ sich der Farbstoffverbrauch für die jeweilige Menge Trockensubstanz berechnen. Nasse Blätter wurden vor der Einwage vorsichtig mit Filtrierpapier getrocknet.

Im gesamten wurden folgende Einzeldaten festgestellt: Zeitpunkt der Ernte, Witterung, Größe und Beschaffenheit des verwendeten Blattmaterials, Verbrauch an Farblösung für die eingewogene Menge Frischsubstanz, bezw. durch Umrechnung für 10 g Frischsubstanz, Wassergehalt und Farbstoffverbrauch umgerechnet für 10 g Trockensubstanz. Diese Zahl ergab ein absolutes Maß für den Vitamin C-Gehalt. Weiterhin konnte aber auch aus diesem Werte das scheinbare Aequivalentgewicht der Ascorbinsäure errechnet werden; dies bedeutet, in wieviel Gramm der jeweilig vorliegenden Trockensubstanz ein Aequivalent Ascorbinsäure = 88 g enthalten ist. Die Feststellung dieses Wertes war wichtig für eine etwaige Reindarstellung von Vitamin C aus Blättern, für die ein möglichst günstiges Verhältnis Ascorbinsäure zu Gesamttrockensubstanz von Bedeutung sein mußte.

Im allgemeinen wurden die laufenden Bestimmungen von Vitamin- und Wassergehalt, so lange sich keine erheblichen Schwankungen bei den gefundenen Werten zeigten, etwa alle 2—3 Wochen vorgenommen; bei den äußerst schwankenden Witterungsverhältnissen im Herbst jedoch in Abständen von wenigen Tagen.

Tabelle I. Untersuchung von Birkenblättern.

Zeit	Witterung	Größe und Beschaffenheit
13. 3. 36	kaltes Wetter, bedeckt	Knospen ohne Hüllblätter
13. 3. 36	„ „ „	Kätzchen, grün
31. 3. 36	warm, trübe, regnerisch	kleinste Blätter
27. 4. 36	„ „ „	kleine Blätter
29. 4. 36	warmes Wetter, bedeckt	mittelgroße Blätter
6. 5. 36	warm, sonnig, schwül	größere Blätter
20. 5. 36	sonnig, sehr warm	„ „
22. 6. 36	warm, leichter Regen	große, saftige Blätter
8. 7. 36	trocken, warm, trübe — Vortag: Gewitterregen	„ „ „
29. 7. 36	sonnig und warm nach längerer Regenzeit	„ „ „
25. 8. 36	sonniges, warmes Wetter	„ „ „
2. 9. 36	warm, trocken, bedeckt	„ „ „
8. 9. 36	trübe, trocken, windig, kühl nach z. T. wärm. Tagen	„ „ „
14. 9. 36	regnerisch, windig, kühl	„ „ „
24. 9. 36	noch warm, bedeckt — nach sonnigen Vortagen	„ nicht mehr saftige Blätter
29. 9. 36	kühl aber sonnig nach kalter Nacht	„ schon gelbliche Blätter
5. 10. 36	kalt aber sonnig nach wechselnden Temp.	„ „ „ „
13. 10. 36	wieder wärmer — Vortag: + 10° (Max.)	„ „ „ „
19. 10. 36	n. läng. warmer Witterg. wieder kälter	„ meist gelbe Blätter
26. 10. 36	warm und trocken — Vortag: kühl u. regnerisch	gelbe Blätter, lose haftend
5. 11. 36	kühl u. trocken n. Regen	abgefallene, welke Blätter

Aus der Tabelle ist folgendes zu ersehen:

Die Knospen der Birke, die schon Mitte März bei kalter Witterung herauskamen, zeigten ebenso wie die am gleichen Tage geernteten Kätzchen einen sehr niedrigen Vitamingehalt, wie der geringe Farbstoffverbrauch für 10 g Frischsubstanz mit 17,3 bzw. 13,8 ccm Farbstofflösung zeigt. Warmes und regnerisches Wetter bedingte bald ein schnelles Wachstum. Etwa 3 Wochen später untersuchte Blättchen von kaum 1 cm Länge zeigten einen erheblichen Sprung in der Zunahme des Vitamingehaltes, nämlich fast das

Wassergehalt in %	Verbrauch ccm Farblösung f. 10 g Frischsubstanz	Verbrauch ccm Farblösung f. 10 g Trockensubstanz	88 g Ascorbinsäure sind enthalten in g Trockensubstanz
40,5	17,3	29,0	344 800
45,6	13,8	25,4	393 700
69,3	131,0	434,0	23 050
74,8	132,0	526,0	19 015
73,4	130,0	483,0	20 705
67,1	181,0	549,0	18 210
64,6	269,0	761,0	13 135
64,3	262,0	734,0	13 620
60,1	330,0	826,0	12 140
61,1	379,0	974,0	10 265
58,6	273,0	660,0	15 150
59,8	233,0	579,0	17 270
57,2	295,0	690,0	14 495
59,0	216,0	526,0	19 010
57,5	234,0	551,0	18 570
61,1	174,0	449,0	22 300
60,6	159,0	403,0	24 790
61,0	222,0	569,0	17 575
62,4	131,0	350,0	28 590
63,0	39,1	106,0	94 810
62,7	38,5	103,0	69 775

Zehnfache (131 ccm Farblösung) des anfangs titrierten Wertes. Dies bestätigt die früher schon festgestellte Tatsache einer plötzlichen Zunahme des Reduktionsvermögens in jungen wachsenden Pflanzenteilen. Dieser Wert blieb nun während eines Monats trotz fortschreitendem Wachstum der Blättchen einigermaßen konstant und stieg dann erst ziemlich gleichmäßig bei Blättern mittlerer Größe weiter an, um etwa Ende Juli bei völlig ausgewachsenen Blättern den Höchstwert 379 ccm Farblösung für 10 g Frischsubstanz zu erreichen, was rund 33 mg Ascorbinsäure entspricht.

Obwohl von März bis Juli die Witterung äußerst unbeständig war, hatte sich eine g l e i c h m ä ß i g e Zunahme des Ascorbinsäuregehaltes feststellen lassen. Diese Tatsache gab zunächst den Anschein, daß Zunahme bzw. Abfall des Reduktionsvermögens in den Blättern unabhängig oder doch zum mindesten nur sehr wenig abhängig vom Wetter seien. Wie sich später zeigte, war diese Annahme nur bedingt richtig.

Vom Höchstwert 379 ccm Farblösung (29. 7.) an war nun trotz gleichbleibender unbeständiger Witterung ein gleichmäßiger Abfall auf 273 ccm (25. 8.) und weiter auf 233 ccm (2. 9.) festzustellen.

Nun setzte in den Anfangstagen des September eine Wärmeperiode von etwa 8 Tagen Dauer ein, so beständig, wie sie im ganzen Sommer nicht festgestellt worden war. Die Folge davon war, daß nun zum ersten Male der Ascorbinsäuregehalt der Blätter wieder anstieg, die Pflanze also zum erstenmal u n a b h ä n g i g v o n d e r J a h r e s z e i t allein von den Witterungsverhältnissen beeinflußt wurde. Es erfolgte ein Anstieg von 233 ccm Farblösung auf 295 ccm (8. 9.) trotz kühler Witterung am Erntetag; dann trat nach mehreren kühlen Tagen wieder ein Abfall auf 216 ccm ein, um bei einer erneuten Wärmeperiode von einigen Tagen Dauer nochmals anzusteigen (234 ccm Farblösung am 24. 9.).

Die Blätter, die äußerlich schon etwas vertrocknet waren, nahmen nun auf Grund schnell einsetzender kälterer Tage und Nächte (Ende September, Anfang Oktober) eine gelbliche Farbe an; ihr Reduktionsvermögen fiel über 174 auf 159 ccm Farblösung (5. 10.) ab. Daß jedoch diese immer mehr zunehmende Gelbfärbung der Blätter, also das Erlöschen der Blattfunktion in Bezug auf den Baum, nicht mit einem sofortigen Verfall der Ascorbinsäure verbunden ist, zeigte der nochmalige Anstieg von 159 auf 222 ccm Farblösung (13. 10.), als erneut eine Wärmeperiode von längerer Dauer einsetzte, bei der im Maximum sogar + 10° C erreicht wurden. Auch blieb der Wassergehalt zu diesem Zeitpunkt noch sehr hoch und ließ vermuten, daß die Zellen noch in einem gewissen Ausmaß tätig seien. Der Einfluß der Witterung auf den Anstieg und Abfall des Reduktionsvermögens konnte also deutlich beobachtet werden. Ich glaube, heute annehmen zu dürfen, daß eine gleichmäßig temperierte Jahreszeit wie der Sommer, mit Schwankungen nur innerhalb von 24 Stunden, auf den Ascorbinsäuregehalt nicht oder kaum von Einfluß ist; daß dagegen Wärme- oder Kälteperioden von längerer Dauer (etwa 8 Tagen) einen Anstieg bzw. Abfall des Reduktionsvermögens unabhängig von der Jahreszeit hervorrufen können.

Es folgten nun Untersuchungen von Blättern, die infolge der kalten Witterung gelb geworden waren. Die schon fast ganz gelb aussehenden Blätter besaßen nur noch ein Reduktionsvermögen von 131 ccm Farblösung, lose am Ast haftende nur noch 39 ccm, ein Wert, der sich auch bei abgefallenen verwelkten Blättern nicht mehr änderte. Die drei letztgenannten Werte der Tabelle I weichen insofern von den anderen ab, als sie sich viel schwieriger ermitteln ließen. Die essigsauren Auszüge dieser Blätter hatten nämlich die Eigenschaft, am Ende der Titration immer noch einige ccm Farbstofflösung langsam zu verbrauchen. Da Ascorbinsäure ziemlich flott reduziert, mußten diese Blätter also eine Zunahme an anderen reduzierenden

Stoffen erfahren haben, die sich schon Wochen früher, wenn auch weniger störend, bei der Titration bemerkbar machten. Die drei letzten angegebenen Werte sind jedoch noch als genau zu betrachten, da sie Titrationswerte bis zum Beginn des Ziehens darstellen.

Die bei den Birkenblättern festgestellten Befunde stimmen mit denen von H. Henke im Vorjahr gefundenen im allgemeinen überein. Abweichungen zeigen sich einmal bei den Knospen, bei welchen H. Henke 70 ccm Farblösung für 10 g Frischsubstanz verbrauchte, während im vorliegenden Falle nur 17,3 ccm Farblösung verbraucht wurden. Hierbei ist allerdings zu beachten, daß die Knospen im Vorjahre erst 4 Wochen später herauskamen und daher vielleicht schon mehr Ascorbinsäure gebildet hatten. H. Henke fand weiter bei lose anhaftenden Blättern kein Reduktionsvermögen mehr, während 10 g solcher Blätter in diesem Jahr noch rund 40 ccm Farblösung verbrauchten, was aber ebenfalls durch die unterschiedlichen Witterungsverhältnisse der beiden Jahre bedingt sein kann.

Die von H. Henke festgestellten erheblichen Schwankungen des Reduktionsvermögens im Laufe des Sommers, die nach seiner Ansicht mit der von Tag zu Tag wechselnden Witterung zusammenhängen sollten, waren in der von mir angestellten Versuchsreihe nicht wahrzunehmen. Wie schon oben gesagt, stieg im vorliegenden Fall der Ascorbinsäuregehalt gleichmäßig bis zum Höhepunkt 379 ccm Farblösung (29. 7.) an. Nach meinen Befunden ergaben sich ähnliche Schwankungen, wie sie H. Henke beobachten konnte, nur bei völlig anormalen Witterungsverhältnissen von einiger Dauer (mehreren Tagen), während im allgemeinen der Anstieg und Abfall des Ascorbinsäuregehaltes gleichmäßig verlief.

Neben der Ascorbinsäurebestimmung wurde von jedem verwendeten Material der Wassergehalt festgestellt. Die Knospen und grünen Kätzchen der Birke enthielten etwa 40—45% Wasser, während die kleinsten und kleineren Blätter mit 70—75% den höchsten Wassergehalt besaßen. Von diesem Wert ging alsdann mit fortschreitendem Wachstum der Wassergehalt gleichmäßig bis auf etwa 57% zurück. Er war also zunächst auch nicht von der Witterung abhängig und stellt damit in seiner alleinigen Abhängigkeit von der Jahreszeit eine Parallele zum Ablauf der Kurve des Vitamingehaltes dar.

Beim Einsetzen der kalten Witterung (Ende September, Anfang Oktober) wurde dann der Wassergehalt von 60% wieder überschritten.

Aus dem Wassergehalt ergaben sich die Werte für den Verbrauch an Farblösung für 10 g Trockensubstanz und hieraus das Maß des absoluten Ascorbinsäuregehaltes. Der günstigste Wert wurde entsprechend dem Wert für Frischsubstanz am 29. 7. mit 974 ccm Farblösung erhalten. Rund 10,3 kg der wasserfreien Substanz entsprachen an diesem Tage 88 g Ascorbinsäure, während z. B. bei Knospen rund das 35fache an Trockensubstanz nötig gewesen wäre.

Tabelle II. Untersuchung von Walnußblättern.

Zeit	Witterung	Größe u. Beschaffenheit
6. 4. 36	sonnig und warm	Knospen ohne Hüllblätter
6. 5. 36	sonnig, sehr warm	Blättchen
27. 5. 36	heißes, trockenes Wetter	mittelgroße Blätter
8. 6. 36	warm und trocken — Vortag: Regen	„ „
22. 6. 36	warm, leichter Regen — Vortag: heiß, Gewitter	große Blätter
24. 6. 36	warmes, trockenes Wetter	„ „
29. 7. 36	sonnig und warm nach längerer Regenzeit	„ „
26. 8. 36	warmes, sonniges Wetter	„ „
31. 8. 36	warm und bedeckt	„ „
7. 9. 36	trübe, regnerisch, kühler	„ „
15. 9. 36	trübe, aber wieder wärm. Vortag: kühl, Regen	große, fleckige Blätter
28. 9. 36	erster kalter Tag nach längerem Regenfall	„ „ „
2. 10. 36	wieder warm und sonnig	„ „ „
7. 10. 36	kalt, teils sonnig nach kalten Tagen	fleck., weniger saftige Blätter
14. 10. 36	wärmer, regnerisch nach 2 warmen Tagen	„ „ „ „
14. 10. 36	„ „ „	abgefallene, teils welke Blätter
5. 11. 36	kühl und trocken nach regnerischem Wetter	„ braune u. „ „
Walnüsse		
8. 6. 36	warm und trocken — Vortag: Regen	kleine grüne Nüsse (Kirschgröße)
24. 6. 36	warmes, trockenes Wetter	mittelgroße grüne Nüsse

Die Tabelle gibt folgende Befunde an:

Die Knospen der Walnußblätter kamen etwa einen Monat später heraus als die der Birken und besaßen schon ein verhältnismäßig hohes Reduktionsvermögen. Innerhalb von 4 Wochen war dann auch im Vitamingehalt nur ein Sprung auf etwas mehr als das Doppelte festzustellen, nämlich von 65 auf 147 ccm Farblösung. Dann trat über einen weiteren Monat hin die bei dem Birkenblatt schon beobachtete Konstanz im Ascorbinsäuregehalt ein, um erst bei größer werdenden Blättern in größeren Sprüngen

Wassergehalt in %	Verbrauch ccm Farblösung f. 10 g Frischsubstanz	Verbrauch ccm Farblösung f. 10 g Trockensubstanz	88 g Ascorbinsäure sind enthalten in g Trockensubstanz
79,8	65	320	31 250
72,6	147	535	18 680
75,5	146	596	16 780
72,4	152	551	18 150
71,0	159	548	18 250
70,9	159	546	18 320
66,0	260	764	13 090
63,0	316	855	11 695
60,6	394	1001	9 985
63,8	307	849	11 780
65,4	291	841	11 890
64,4	218	612	16 330
62,6	275	735	13 605
61,4	179	465	21 500
61,4	201	520	19 235
19,9	140	175	57 320
46,6 (Bodennässe)	(37)	69	145 530
87,2	181	1412	7 800
73,7	238	906	11 040

gleichmäßig anzusteigen. Der Höhepunkt mit 394 ccm Farblösung wurde Ende August erreicht, ein Wert, der mit dem Höchstwert der Birke (379) gut übereinstimmt. Der von H. Henke aus Einzelbestimmungen angegebene Wert von 1350 ccm Farblösung für 10 g Frischsubstanz konnte niemals festgestellt werden, auch dann nicht, als wiederholt Material vom gleichen Baume verwendet wurde, dessen Blätter H. Henke im Vorjahre untersucht hatte. Die von mir an diesen Blättern gefundenen Werte stimmten mit dem in meiner Tabelle angeführten Werte gut überein (400 ccm Farblösung).

Bei den Walnußblättern nahm ebenfalls das Reduktionsvermögen bis zum Höhepunkt (394 ccm Farblösung am 31. 8.) gleichmäßig zu, ohne daß Schwankungen nach unten, die man etwa auf den Einfluß der Witterung hätte zurückführen können, beobachtet wurden. Auch in den kommenden Stadien verhielten sie sich übereinstimmend mit den Birkenblättern: zunächst trat bei gleichbleibender Witterung ein gleichmäßiger Abfall ein; dann folgte auf Grund der verschiedenen, längere Zeit anhaltenden Temperaturschwankungen der dreimalige Wechsel in Anstieg und Abfall des Vitamingehaltes; schließlich wurde mit 37 ccm Farblösung für 10 g Frischsubstanz (gegenüber 39 der Birkenblätter) der Endwert für abgefallene verwelkte Blätter erreicht.

Am Wassergehalt der Walnußblätter wurden geringere Schwankungen als an dem der Birkenblätter wahrgenommen. Der sehr hohe Wert für abgefallene welke Blätter (5. 11.) ist auf Bodennässe zurückzuführen und daher in der Versuchsreihe für den Farbstoffverbrauch für Frischsubstanz nicht mehr zu berücksichtigen.

Tabelle III. Untersuchung von Johannisbeerblättern.

Zeit	Witterung	Größe u. Beschaffenheit
12. 3. 36	kalt, bedeckt, + 1°	
	Vortag: sonnig, warm	Knospen ohne Hüllblätter
23. 3. 36	trocken, warm, sonnig	kleinste Blätter
30. 3. 36	trüber, warmer Tag	
	nach leichtem Nachtregen	kleine Blätter
3. 4. 36	weiter trüb. u. warm. Wett.	mittlere Blätter
15. 4. 36	sonnig und warm	mittelgroße Blätter
11. 5. 36	sehr warmes und	
	sonniges Wetter	große Blätter
22. 5. 36	trocken u. warm; bedeckt	" "
22. 6. 36	warm, leichter Regen —	
	Vortag: heiß, Gewitter	" "
2. 7. 36	warm, trocken, bedeckt	" "
24. 8. 36	sonniges, warmes Wetter	" "
3. 9. 36	feucht und neblig,	
	dabei warm	" "
11. 9. 36	sonnig und warm —	
	Vortag: stechend heiß	" "
30. 9. 36	kühl und bedeckt	
	nach 2 kälteren Tagen	" "
6. 10. 36	kalt und windig; bedeckt	
	nach kalten Tagen	letzte große Blätter vom Strauch
6. 10. 36	" " "	abgefallene, teils welke Blätter
22. 10. 36	kühles, trübes Wetter	verwelkte, grünlich-braune Bl. (an der Luft getrocknet)

Daneben wurden, als die Blätter mittelgroß bzw. ausgewachsen waren, die grünen N ü s s e untersucht, um das Verhältnis des Ascorbinsäuregehaltes von Frucht und Blatt kennen zu lernen. Kleine Nüsse von der Größe einer Kirsche titrierten etwas mehr als die am gleichen Tage geernteten Blätter. Da sie jedoch mit 87,2% einen sehr hohen Wassergehalt besaßen, so war ihr Reduktionsvermögen auf Trockensubstanz berechnet ebenfalls außerordentlich hoch (1412 ccm Farblösung). Die mittelgroßen grünen Nüsse, die etwa 14 Tage später untersucht wurden, zeigten für Frischsubstanz einen Anstieg von 181 auf 238 ccm Farblösung. Wie die Tabelle II zeigt, war während dieses Anstieges der Nüsse der Ascorbinsäuregehalt der Blätter unverändert zwischen 150 und 160 ccm Farblösung stehen geblieben. Erst einige Tage später erfolgte auch bei den Blättern der Weiteranstieg.

Auf Trockensubstanz berechnet war das Reduktionsvermögen der mittelgroßen Nüsse gegenüber denen von Kirschgröße erheblich zurückgegangen (von 1412 auf 906 ccm Farblösung), da ihr Wassergehalt auf 73,7% gesunken war.

Wassergehalt in %	Verbrauch ccm Farblösung f. 10 g Frischsubstanz	Verbrauch ccm Farblösung f. 10 g Trockensubstanz	88 g Ascorbinsäure sind enthalten in g Trockensubstanz
75,0	157	627	15 960
76,9	202	867	11 540
76,3	206	869	11 500
76,1	261	1094	9 140
78,7	249	1171	8 540
76,1	322	1347	7 420
72,2	568	2041	4 900
70,0	567	1889	5 280
65,0	722	2070	4 830
64,2	613	1713	5 840
57,5	658	1584	6 315
54,3	714	1564	6 395
56,8	592	1371	7 295
59,4	488	1204	8 305
26,5	201	274	36 550
13,1	242	279	35 885

Aus der Tabelle ist folgendes ersichtlich:

Die Blätter der roten Johannisbeere verhielten sich in mehreren Punkten verschieden von denen der Birke und Walnuß. Zunächst besaßen die Knospen, die gleichzeitig mit den Birkenknospen Mitte März herauskamen, bereits ein sehr hohes Reduktionsvermögen (157 ccm Farblösung). An den bald folgenden kleinsten Blättern war dann nur ein verhältnismäßig geringer Anstieg des Ascorbinsäuregehaltes festzustellen (202 ccm Farblösung). Nach bald einsetzendem gleichmäßigen Anstieg des Reduktionsvermögens ohne Schwankung nach unten wurde am 2. 7. mit 722 ccm Farblösung für 10 g Frischsubstanz der Höchstwert erreicht. Der Gehalt an Ascorbinsäure war also in den Johannisbeerblättern auf nahezu das Doppelte des Höchstwertes der beiden anderen Blattsorten angestiegen.

Uebereinstimmend mit den Blättern von Birke und Walnuß konnte auch bei den Johannisbeerblättern während der zu Anfang stattfindenden Zunahme des Vitamingehaltes ebenfalls keine Beeinflussung durch die schwankenden Witterungsverhältnisse festgestellt werden. Alsdann setzte auch bei den Johannisbeerblättern der früher schon beschriebene, von der Witterung unabhängige Abfall ein. Darauf folgten, entsprechend der länger andauernden Schwankungen der Witterung die schon bei den Birken- und Walnußblättern beschriebenen Aenderungen im Ascorbinsäuregehalt. Bemerkenswert bei all diesen Schwankungen war, daß die Johannisbeerblätter weiterhin ein verhältnismäßig hohes Reduktionsvermögen behielten (714 ccm Farblösung am 11. 9.). Lose am Strauch haftende Blätter besaßen mit 488 ccm Farblösung einen noch weit höheren Vitamingehalt, als die Blätter der Birke und Walnuß in ihren Höchstwerten. Selbst als die Blätter welk und bereits vom Strauch abgefallen waren, verbrauchten 10 g Frischsusbtanz immer noch 201 bzw. 242 ccm Farblösung.

Aus diesen Werten ist klar ersichtlich, daß Johannisbeerblätter nicht nur größere Vitaminmengen zu bilden vermögen, sondern daß sie auch die Fähigkeit besitzen, diese Substanz sich lange zu erhalten. Es besteht die Möglichkeit, daß das Johannisbeerblatt gleichzeitig mit Vitamin einen Vitaminschutzstoff bildet oder aber weniger von zerstörenden Enzymen.

Bei den beiden letzten Werten der Tabelle III war wie bei den Birkenblättern am Ende der Titration ein ziehender Verbrauch an Farbstoff zu bemerken, der für die genaue Ermittlung der Titrationswerte nicht berücksichtigt wurde.

Der Abfall des Wassergehaltes vollzog sich — von kleineren Schwankungen abgesehen — ziemlich gleichmäßig. Die Höchstwerte wurden bei kleinen bis mittelgroßen Blättern gefunden. Nach dem Rückgang des Wassergehaltes bis auf 54,3% (11. 11.) folgte ähnlich den anderen Blattsorten ein Wiederanstieg auf nahezu 60%, worauf er über 26,5% auf den Wert 13,1% für lufttrockene Blätter abfiel.

Auf 10 g Trockensubstanz berechnet erreichten die Johannisbeerblätter den außerordentlich hohen Wert von 2070 ccm Farblösung (am 2. 7., bei einem Wassergehalt von 65%). Ein ähnlich hoher Wert wurde mit 2041

ccm Farblösung bereits früher (am 22. 5.) einmal festgestellt, als die entsprechende Frischsubstanz nur 568 ccm Farblösung verbrauchte, aber der hohe Wassergehalt von 72,2% vorlag.

II. Die Einwirkung von Vitamin C auf Silbernitrat.

Nach Versuchen von H. Henke (2) zeigten jüngere Birkenblätter an verschiedenen Stellen eine deutliche Dunkel- bzw. Schwarzfärbung durch ausgeschiedenes Silber, wenn sie einige Zeit mit Silbernitrat in Berührung gekommen waren. Diese kräftige Reduktion wurde immer beobachtet, ob nun Blattstücke wenige Minuten völlig in einer Silbernitratlösung gelegen hatten, oder ob unverletzte Blätter mehrere Stunden mit dem Stengel in solche Lösungen gestellt worden waren. Besonders einzelne Stellen, die Drüsenschuppen, mußten eine starke Reduktion ausüben, da sie tiefschwarz gefärbt waren. Da die spontane und kräftige Reduktion von Silbernitrat durch Ascorbinsäure schon seit langem bekannt ist, hat H. Henke die Vermutung ausgesprochen, daß die Dunkelfärbung der Birkenblätter in erster Linie auf die Anwesenheit von Ascorbinsäure zurückzuführen sei und daß im besonderen der Sitz der Ascorbinsäure in den Drüsenschuppen der Blätter gesucht werden müsse. Eine quantitative Bestimmung des Silbernitratverbrauches durch Blattauszüge konnte nicht vorgenommen werden, da sich das kolloidal ausfallende Silber nicht filtrieren ließ und daher eine genaue Titration nicht ermöglichte.

Ich habe nun diese Versuche erneut in Angriff genommen und bin zu folgenden Ergebnissen gekommen:

a) Das mikroskopische Bild.

Die Henkeschen Versuche wurden mit jüngeren Blättern wiederholt, indem diese zunächst 24 Stunden lang mit dem Stengel in eine n/10-Silbernitratlösung gestellt wurden. Unter dem Mikroskop zeigten sich die Hauptadern des Blattes und das daran anschließende Gewebe hellbraun gefärbt; die Nebenadern hatten kein Silbernitrat reduziert, während ein Teil der Drüsen auf den Nebenadern schwarzbraun gefärbt war. Das unbehandelte Blatt dagegen zeigte helle Drüsenschuppen.

Von den gleichen Blättern wurden kleine Mittelstücke unter das Mikroskop gelegt und einige Tropfen Silbernitratlösung an den Schnittstellen des Blattes aufgetropft. Dabei färbten sich die Schnittstellen sofort braunschwarz, dann folgten wenige Minuten später einzelne Drüsenschuppen, während das übrige Gewebe noch unverändert vorlag.

Das waren also die gleichen Erscheinungen, wie sie H. Henke im vorhergehenden Jahre beobachtet hatte.

Anschließend habe ich 4 Wochen später Birkenblätter, die schon eine gelbliche Farbe angenommen hatten, in der gleichen Weise untersucht. Wie Parallelversuche ergaben, besaßen diese Blätter noch einen erheblichen Gehalt an Ascorbinsäure (s. S. 8/9). Merkwürdigerweise waren die Drüsenschuppen dieser Blätter schon schwarzbraun gefärbt, obwohl sie noch nicht mit Silbernitrat in Berührung gekommen waren. Die Drüsen schienen verharzt zu sein. Diese Tatsache schon steht im Gegensatz zu dem mit Dichlorphenolindophenol festgestellten hohen Reduktionsvermögen der gelblichen Blätter, wenn man den Drüsen eine besondere Bildungsfunktion für Ascorbinsäure zuschreiben will. Das sonstige Bild des unbehandelten Blattes war nicht verändert. Ich habe diese Blätter dennoch 24 Stunden in eine n/10-Silbernitratlösung eingestellt und folgendes feststellen können:

Die Haupt- und Nebenadern saugten die Flüssigkeit immer noch gut auf und hatten eine hellbraune Färbung angenommen. Dagegen war das Gewebe links und rechts der Adern jeweils in deren Breite schwarzbraun gefärbt, mußte also erhebliche Mengen an reduzierenden Stoffen enthalten. Die Drüsenschuppen waren durch das Silbernitrat nicht sichtbar beinflußt.

Zu kleinen Mittelstücken der gleichen Blätter (Drüsenschuppen bereits schwarzbraun) wurden nun einige Tropfen Silbernitratlösung gegeben. Die Flüssigkeit drang an den Schnittstellen ziemlich schnell und gleichmäßig in das gesamte Gewebe ein, welches sich nach wenigen Minuten schwarzbraun färbte, während die Blattadern nun kaum gefärbt waren und hell durchleuchteten. An den Drüsenschuppen war wieder keine Veränderung zu bemerken.

Auf Grund dieser Befunde und da andere reduzierende Stoffe außer Ascorbinsäure (wie wir später noch sehen werden) in ihrer Einwirkung auf Silbernitrat eine allzu große Rolle spielen, so ist es doch weitaus sicherer, anzunehmen, daß die Ascorbinsäure gleichmäßig im Blatt gebildet wird und verteilt ist.

Meine späteren quantitativen Versuche zeigten ferner, daß das bevorzugte Reduktionsvermögen der Drüsenschuppen jüngerer Blätter nicht allein von Ascorbinsäure herzurühren braucht, was ebenso gegen eine Sonderstellung der Drüsenschuppen spricht, wie die Feststellung des stärkeren Reduktionsvermögens im Gewebe der älteren, aber noch sehr vitaminreichen und zur Neubildung von Ascorbinsäure befähigten Blätter.

b) Einwirkung reiner Ascorbinsäure auf Silbernitrat.

Um das Reduktionsvermögen von Ascorbinsäure gegenüber Silbernitrat in pflanzlichen Stoffen erfassen zu können, war es nötig, die Einwirkung reiner Ascorbinsäure („Cebion") auf Silbernitrat quantitativ festzulegen, da in Pflanzensäften von vornherein mit einer gleichzeitigen Reduktionswirkung anderer organischer Verbindungen gerechnet werden mußte. Eine gravimetrische Bestimmung des Silbernitratverbrauches erwies sich nach Vorversuchen als zu zeitraubend. Die Titration nach Volhard in salpetersaurer Lösung schien ungeeignet, da durch Spuren von kolloidalem

Silber, die möglicherweise das Filter passieren und durch den Säurezusatz wieder in Silbernitrat zurückgebildet werden konnten, ungenaue Werte zu erwarten waren. Am geeignetsten zur Bestimmung des Silbernitratverbrauches war daher die Titration nach M o h r in neutraler Lösung, bei der eine geringe Trübung des Filtrates nicht stört. Wie sich später zeigte, konnte die Silberausscheidung nach besonderer Behandlung gut filtriert werden. Als geeignetste Silbernitratkonzentration zur genauen Bestimmung erwies sich eine n/10-Lösung.

Von einer wässrigen Lösung von Ascorbinsäure (ungefähr n/100), deren Gehalt mittels Dichlorphenolindophenollösung festgestellt wurde, wurden 10 ccm in ein Becherglas gegeben und 10 ccm einer n/10-Silbernitratlösung hinzugegeben. Schon nach wenigen Sekunden zeigte sich eine starke, hell- bis dunkelgraue Ausscheidung von Silber und vielfach ein Silberspiegel. Der Niederschlag wurde sogleich abfiltriert (es wurden teilweise 2 Faltenfilter benötigt), die klare Lösung in eine Mikrobürette gegeben und gegen 2 ccm einer n/10-Kochsalzlösung unter Verwendung von Kaliumchromat als Indikator titriert. Aus dem Verbrauch an Silbernitratlösung ließ sich dann die Gesamtmenge des unverbrauchten Silbernitrates errechnen. Die beiden Stoffe Ascorbinsäure und Silbernitrat konnten währenddessen etwa 10 Minuten aufeinander einwirken. Wie spätere Titration bei gleichen Lösungen etwa nach 30 Minuten oder 24 Stunden ergaben, war die Reaktion nach dem erstgenannten Zeitpunkt von 10 Minuten vollkommen beendet. Daneben erwies sich als gleichgültig, ob Silbernitratlösung zu Ascorbinsäurelösung gegeben oder umgekehrt verfahren wurde: jedesmal war die Reaktion nach etwa 10 Minuten beendet und ein übereinstimmender Silbernitratverbrauch festzustellen.

Titration und Berechnung des Silbernitratverbrauches seien an folgendem Beispiel angegeben:

2,00 ccm n/10-Kochsalzlösung titrierten von der teilweise reduzierten Silbernitratlösung 4,33 ccm.

Durch Division der vorgelegten Anzahl ccm Kochsalzlösung durch die zurücktitrierte Anzahl ccm Silbernitratlösung (2,00 dividiert durch 4,33) ergibt sich der Faktor der teilweise reduzierten Silbernitratlösung zu 0,4619.

Durch Multiplikation dieses Faktors mit der Gesamtmenge der beiden angewandten Lösungen (20,00 ccm) ergibt sich die unverbrauchte Gesamtmenge der teilweise reduzierten Silbernitratlösung zu 9,24 ccm.

Vorgelegt wurden	10,00	ccm n/10 $AgNO_3$-Lösung,
zurücktitriert wurden	9,24	„ „ „ „ „
verbraucht wurden	0,76	„ „ „ „ „

0,76 ccm n/10-Silbernitratlösung wurden von 10 ccm Ascorbinsäurelösung reduziert, die in diesem Falle 92,0 ccm n/1000 Dichlorphenolindophenollösung oder 8,1 mg Ascorbinsäure entsprachen.

1 mg Ascorbinsäure verbrauchte demnach 0,094 ccm n/10-Silbernitratlösung = 1,60 mg Silbernitrat.

Es wurden mehrere Titrationen mit wechselnden Ascorbinsäurekonzentrationen in jeweils 10 ccm Lösung vorgenommen, deren Werte ziem-

lich gut übereinstimmten und die in folgender Tabelle zusammengestellt sind:

mg Ascorbinsäure	Gesamtverbrauch von n/10-$AgNO_3$-Lösung in ccm	ccm n/10-$AgNO_3$-Lösung auf 1 mg Ascorbinsäure
8,1	0,760	0,094
9,5	0,888	0,093
11,0	1,090	0,099
15,0	1,496	0,099
8,1	0,760	0,094
11,4	1,110	0,097

Als Mittelwert hieraus ergab sich:

0,096 ccm n/10-Silbernitratlösung = 1,63 mg Silbernitrat.

1 mg Ascorbinsäure reduzierte also 1,63 mg Silbernitrat, 0,088 mg Ascorbinsäure 0,143 mg Silbernitrat. (Wenn man annimmt, daß ein Aequivalent Ascorbinsäure mit einem Aequivalent Silbernitrat reagiert, so hätten 88,0 g Ascorbinsäure 169,888 g Silbernitrat reduzieren müssen, 1 mg Ascorbinsäure also 1,931 mg Silbernitrat).

c) Einfluß der p_H-Stufe.

Im Anschluß an die Befunde mit reiner Ascorbinsäure wurden nun Blattauszüge und Fruchtsäfte in ihrer Einwirkung auf Silbernitrat geprüft. Durch Vorversuche konnte zunächst festgestellt werden, daß saure Blattauszüge, ferner Säfte von Zitronen und Orangen sich in der Stärke ihrer Einwirkung auf Silbernitrat scheinbar sehr verschieden verhielten; schon rein äußerlich war diese Tatsache durch die verschiedene Art der Färbungen des ausgeschiedenen Silbers zu erkennen.

Stark saure Auszüge oder Pressäfte zu einer wässrigen Lösung von Silbernitrat gegeben, zeigten zunächst keine sichtbaren Veränderungen. Erst nach 10—20 Minuten gab sich eine langsame Silberausscheidung durch eine zunehmende Färbung von rosa bis braun in der Flüssigkeit zu erkennen. Das Silber wurde in stark saurer Lösung nur in kolloidaler Form ausgeschieden und konnte selbst nach mehrtägigem Stehen nicht filtriert werden.

Blattauszüge mit 0,2%iger Essigsäure hergestellt, oder Zitronensaft, mit wenig Natriumacetat gepuffert, also schwach saure Lösungen, zeigten bereits nach 30 Minuten durch Schwarzfärbung eine starke Silberausscheidung an, die nach 24stündigem Stehen gut filtriert werden konnte.

Nahezu neutrale Auszüge, die durch Zusatz von viel Natriumacetat hergestellt wurden, ergaben dagegen eine sofortige Schwarzfärbung. Hier wurde das Silber genau so schnell ausgeschieden wie durch reine Ascorbinsäure und konnte auch sogleich abfiltriert werden.

Um entscheiden zu können, ob die kolloidale bzw. kristalline Silberausscheidung, sowie die Geschwindigkeit der Ausscheidung nur von der Sättigung der Lösung mit Salzen oder von der jeweils vorliegenden p_H-Stufe abhängig war, wurden anstelle des Natriumacetats neutrale Elektrolyte in die vitaminhaltigen Flüssigkeiten gegeben. So

wurde zunächst Zitronensaft nacheinander mit Kaliumcitrat, Ammoniumsulfat und Kaliumsulfat gesättigt und dann Silbernitrat darauf einwirken lassen. In solchen Lösungen ging die Silberausscheidung ganz langsam vor sich; die Flüssigkeit hatte nach 62 Stunden eine dunkelbraune Farbe angenommen und war nicht filtrierbar. Neutrale Elektrolyte waren also nicht von Einfluß auf die Silberausscheidung.

Daneben wurde, um die kolloidale Ausfällung des Silbers in reinem Zitronensaft vermeiden oder einschränken zu können, einige Tropfen einer kolloidalen Eisenhydroxydlösung zugesetzt. Die entstandene Fällung wurde abfiltriert und auf das Filtrat, dessen Reduktionsvermögen nach der vor und nach der Fällung vorgenommenen Farbstofftitration etwas zurückgegangen war, eine Silbernitratlösung einwirken lassen. Die Silberausscheidung wurde durch die vorausgehende Fällung kolloidaler Stoffe zunächst nicht sichtbar beeinflußt, hatte sich aber nach dem Stehen über Nacht doch soweit verändert, daß sie abfiltriert werden konnte. Die kolloidalen Stoffe des Zitronensaftes spielten also für die Silberausscheidung eine gewisse Rolle.

Wichtiger ist wohl der Befund, daß zum wenigsten die Art der Silberausscheidung, ob kolloidal oder kristallin, in erster Linie von der p_H-Stufe der jeweilig vorliegenden Lösung abhängig ist.

Während eine Verschiebung der p_H-Stufe nach dem Neutralpunkt eine schnell sichtbar werdende Silberausscheidung hervorrief, bewirkte ein Zusatz von Säure eine noch später zu erkennende Ausscheidung, als sie durch den Zusatz von neutralen Elektrolyten festgestellt worden war.

Ein Zitronensaft, der mit einigen ccm Essigsäure (20%ig) versetzt war und zu Silbernitratlösung gegeben wurde, war in seiner Farbe noch unverändert, während sich in den gleichzeitig angesetzten Lösungen mit den oben genannten Elektrolyten bereits etwas Braunfärbung bemerkbar machte. Später zeigte auch die Lösung mit Essigsäure eine langsam zunehmende Braunfärbung; diese Ausscheidung war ebenfalls nach 62 Stunden nicht filtrierbar.

d) Einfluß des Lichtes.

Quantitative Vorversuche sollten alsdann zeigen, inwieweit der Einfluß des Lichtes auf die Reaktion Ascorbinsäure—Silbernitrat während einer Versuchsdauer von 10 Minuten sich bemerkbar machen könnte. Es wurden hierzu wieder Pressäfte von Zitronen und Apfelsinen benutzt, die einerseits im farblosen, andererseits im braunen Erlenmeyer mit aufgesetzter Glashaube mit Silbernitratlösung versetzt wurden. Die ermittelten Werte für den Silbernitratverbrauch waren in beiden Reaktionsgefäßen übereinstimmend; die Einwirkung des Lichtes war also auf die Reaktion Ascorbinsäure—Silbernitrat während der Reaktionsdauer von 10 Minuten ohne meßbaren Einfluß.

e) Einfluß der Temperatur.

Im Gegensatz zum Lichteinfluß erwiesen sich Temperatureinflüsse für eine genaue Bestimmung der reduzierenden Wirkung der Ascorbinsäure und anderer Stoffe auf Silbernitrat von entscheidender Bedeutung.

Ich habe nun einerseits Gemische von Fruchtsäften und Silbernitrat bei Zimmertemperatur aufeinander einwirken lassen, andererseits solche Gemische einige Minuten gekocht. Dabei war schon äußerlich der verschieden starke Grad der Reduktionswirkung zu beobachten. Während die kalt angesetzte Lösung noch farblos war, zeigte die gekochte bereits eine tiefbraune Färbung. Die gekochten Gemische zeigten dann auch bei der Titration einen 10—20fachen Verbrauch an Silbernitrat gegenüber den ungekochten, je nachdem, ob Orangen- oder Zitronensäfte benutzt worden waren.

Die Tatsache, daß in der Wärme noch andere organische Stoffe neben der Ascorbinsäure in besonderem Maße Silbernitrat reduzieren, ließ Reaktionen unter solchen Bedingungen ausscheiden. Meine folgenden quantitativen Versuche sind daher alle bei Zimmertemperatur ausgeführt worden.

f) Einfluß der Zeit.

Nun wurde versucht, das Vitamin C in Blattauszügen und Fruchtsäften in der gleichen Weise mit n/10-Silbernitratlösung quantitativ zu erfassen, wie es mit der reinen Substanz („Cebion") geschehen war.

Als Ausgangsmaterial wurde ein Kochauszug von Blättern mit 0,2%iger Essigsäure hergestellt, der mit Natriumacetat bis nahe zum Neutralpunkt gepuffert wurde, um schnell eine filtrierbare Fällung zu erhalten. 10 ccm dieses Auszuges reduzierten 13,5 ccm einer n/1000-Dichlorphenolindophenollösung, was 1,19 mg Ascorbinsäure entspricht. Zu 10 ccm Auszug wurden nun 10 ccm n/10-Silbernitratlösung gegeben, worauf eine sofortige kristalline Silberausscheidung eintrat, die leicht filtriert werden konnte. Das klare Filtrat wurde in eine Mikrobürette gegeben und mit einer n/10-Kochsalzlösung zurücktitriert. Nach etwa 10 Minuten Einwirkungsdauer bis zum Zeitpunkt der Titration hatte der Blattauszug 1,85 ccm n/10-Silbernitratlösung verbraucht. Da im gesamten 1,19 mg Ascorbinsäure vorhanden waren, so waren für 1 mg Ascorbinsäure 1,56 ccm n/10-Silbernitratlösung verbraucht worden. Nach meinen Versuchen mit reiner Ascorbinsäure hätte jedoch 1 mg Vitamin C nur 0,096 ccm n/10-Silbernitratlösung verbrauchen dürfen. Da nun der gefundene Wert für den Blattauszug etwa das 16fache an Reduktionsvermögen der anwesenden Ascorbinsäure ausmachte, so mußten während der Einwirkungsdauer von 10 Minuten andere reduzierende Körper bevorzugt auf das Silbernitrat eingewirkt haben.

Um zu besseren Ergebnissen zu kommen, mußte die Dauer der Reaktion verkürzt werden. Dabei waren jedoch Störungen durch andere reduzierende Stoffe außer Ascorbinsäure auszuschalten. Ich habe daher Zeitversuche unterhalb der 10-Minuten-Grenze zunächst wieder mit reiner Ascorbinsäure vorgenommen.

Die Reaktion mußte also, da das Filtrieren und Einfüllen der teilweise reduzierten Silbernitratlösung in die Bürette zu viel Zeit in Anspruch nahm, noch vor diesen Handhabungen unterbrochen werden. Ich bin nun so vorgegangen, daß ich zu einer Ascorbinsäurelösung Silbernitratlösung gegeben und dann das Gemisch in zeitlichen Abständen mit einem bekannten Ueber-

schuß an n/10-Kochsalzlösung versetzt habe. Dadurch konnte die Reduktionswirkung in jedem beliebigen Zeitpunkt unterbrochen werden.

Das bei diesem Versuch entstehende Niederschlagsgemisch von Silber und Silberchlorid wurde dann filtriert und das klare Filtrat in die Mikrobürette gegeben. Der verbliebene Ueberschuß an n/10-Kochsalzlösung konnte dann mit n/10-Silbernitratlösung zurücktitriert und aus dem gefundenen Werte die Menge des verbrauchten Silbernitrates berechnet werden.

Ich habe nun zu einem Gemisch von 10 ccm Ascorbinsäurelösung von bekanntem Reduktionsvermögen und 10 ccm einer n/10-Silbernitratlösung nach wenigen Sekunden, nach 2 Minuten, 4 Minuten und 6 Minuten 12 ccm einer n/10-Kochsalzlösung gegeben und folgende Titrationswerte gefunden:

mg Ascorbinsäure	NaCl-Zugabe nach	Gesamtverbrauch ccm n/10-$AgNO_3$-Lösung	Verbrauch an ccm n/10-$AgNO_3$-Lg. für 1 mg Ascorbinsäure
6,16	wenigen Sekund.	0,30	0,049
6,16	2 Minuten	0,30	0,049
6,16	4 „	0,42	0,068
6,16	6 „	0,60	0,097

Mit der gleichen Ascorbinsäurelösung wurde ein Vergleichsversuch wie früher über 10 Minuten Einwirkungsdauer ausgeführt, der einen, mit dem letzten Tabellenwert übereinstimmenden Silbernitratverbrauch ergab.

Diese Versuche zeigten, daß bei Anwendung der angegebenen Stoffkonzentrationen die Reaktion Ascorbinsäure—Silbernitrat in ihrem Ablauf zeitlich abhängig ist, daß also erst nach etwa 6 Minuten Einwirkungsdauer die gesamte Reduktionswirkung der vorliegenden Ascorbinsäuremenge beendet ist. Ueber 6 Minuten hinaus war, wie schon frühere Zeitversuche über 24 Stunden gezeigt haben, keine weitere Reduktion von Silbernitrat festzustellen.

g) Einwirkung von gepufferten Blattauszügen und Fruchtsäften auf Silbernitrat.

Nun wurde in der gleichen Weise wie bei der Reaktion Ascorbinsäure—Silbernitrat die Einwirkungsdauer von essigsauren Blattauszügen, die mit Natriumacetat gepuffert waren, mit Hilfe von Kochsalzlösung verkürzt. Schon nach einer Reaktionsdauer von wenigen Sekunden konnte für die gepufferten Blattauszüge folgendes festgestellt werden: Für die Anwesenheit von 1 mg Ascorbinsäure (bestimmt durch Dichlorphenolindophenol) wurde ein Silbernitratverbrauch von 0,73 ccm n/10-Lösung gefunden. Dies ist, verglichen mit reiner Ascorbinsäurelösung, die achtfache Menge. Also hatten auch innerhalb dieser kurzen Einwirkungsdauer schon andere organische Körper in den Blattauszügen Silbernitrat verbraucht. Als Vergleich zu diesem Befund sei an den ersten Versuch mit gepufferten Blattauszügen erinnert, bei dem infolge der langen Einwirkungsdauer von etwa 10 Minuten auf Silbernitrat das Sechzehnfache an Reduktionsvermögen des wirklich vorhandenen Ascorbinsäuregehaltes gefunden worden war.

Die gleichen Feststellungen einer schon nach wenigen Sekunden Einwirkungsdauer über den wirklich vorhandenen Ascorbinsäuregehalt hinausgehenden Reduktion von Silbernitrat wurde an Zitronensäften gemacht, die mit Natronlauge genau neutralisiert worden waren. Die Silberausscheidung war hierbei besonders gut zu bemerken; nach sofortiger Unterbrechung der Reaktion mittels Kochsalz wurde nahezu das Fünffache des Silbernitratverbrauches festgestellt, welches die wirklich vorhandene Ascorbinsäuremenge hätte reduzieren dürfen.

Für einen essigsauren Auszug von Zitronenschalen, der mit Natriumacetat gepuffert war, wurde ebenfalls schon nach wenigen Sekunden Einwirkungsdauer das fünffache Reduktionsvermögen des vorhandenen Ascorbinsäuregehaltes festgestellt, obwohl die sichtbare Silberausscheidung bedeutend langsamer vor sich gegangen war. Die Art und Geschwindigkeit der auftretenden Färbungen einer reduzierten Silbernitratlösung war also nicht abhängig von der Menge des ausgeschiedenen Silbers.

h) Einwirkung von sauren Fruchtsäften auf Silbernitrat.

Da nun die Silberausscheidung pflanzlicher Auszüge in neutraler und schwach saurer Lösung so hoch war, daß sie für eine Bestimmung des reinen Ascorbinsäuregehaltes in solchen Substanzen nicht angewandt werden konnte, ließ ich saure Zitronensäfte auf Silbernitratlösung einwirken, obwohl bei diesen Säften bisher während kurzer Einwirkungsdauer nicht die geringste Silberausscheidung sichtbar festgestellt worden war.

Zu 5 ccm Zitronensaft wurden 10 ccm n/10-Silbernitratlösung und nach Umschütteln 12 ccm n/10-Kochsalzlösung gegeben. Um die vorliegende saure Lösung nach Mohr titrieren zu können, wurde eine dem Säuregehalt des Zitronensaftes entsprechende Menge n/4-Natronlauge zugegeben. Die Lösung wurde dann filtriert und der Kochsalzüberschuß zurücktitriert. Dabei wurde für 1 mg anwesende Ascorbinsäure ein Silbernitratverbrauch von 0,25 ccm n/10-Lösung gefunden, der ebenfalls im Vergleich zur reinen Ascorbinsäure viel zu hoch war. Die alleinige Reduktionswirkung der Ascorbinsäure in Pflanzenauszügen ließ sich also auch in saurer Lösung nicht erfassen, da andere organische Körper hierin ebenfalls Silbernitrat zu reduzieren vermögen.

III. Versuche zur Reindarstellung von Vitamin C aus Birkenblättern.

Die quantitativen Versuche mit Auszügen von Birkenblättern und deren Einwirkung auf Silbernitrat hatten deutlich auf die Anwesenheit von organischen Körpern hingewiesen, die sich der Ascorbinsäure hinsichtlich ihrer Löslichkeit und Reduktionswirkung gegenüber dem Silbersalz sehr ähnlich verhielten, und daher auch schwer von ihr zu trennen waren. Eine Reindarstellung von Vitamin C aus Birkenblättern aber konnte nur gelingen, wenn diese Trennung sich ermöglichen ließ.

Schon bei früheren Versuchen zur Gewinnung der Ascorbinsäure aus Birkenblättern erwies sich als Voraussetzung die Darstellung von Blattauszügen mit möglichst niedrigem scheinbaren Aequivalentgewicht, d. h. von Auszügen, die ein hohes Reduktionsvermögen und dabei einen möglichst geringen Gehalt an Trockensubstanz besitzen mußten. Als Lösungsmittel waren im allgemeinen verdünnte Säuren angewandt und die bisher günstigsten Ergebnisse mit Essigsäure erzielt worden. Die dabei gefundenen scheinbaren Aequivalentgewichte lagen jedoch immer noch weit über 1000.

Eine Wiederholung dieser Versuche mit 0,2—2,2%iger Essigsäure ergab zunächst auch keine besseren Werte.

Eine recht günstige Ausnahme zeigte sich nun, als Blätter verwendet wurden, auf welche es stark geregnet hatte. Ein aus solchen Blättern hergestellter Auszug gab ein scheinbares Aequivalentgewicht von 900—1000. Ich nahm nun zunächst an, daß die äußerliche Reinigung der Blätter durch den Regen das scheinbare Aequivalentgewicht so stark herabgesetzt hätte und habe, um den Effekt des Regens zu wiederholen, bei trockener Witterung geerntete Blätter 24 Stunden in Wasser gelegt, bevor sie mit Essigsäure behandelt wurden. Das scheinbare Aequivalentgewicht von Auszügen derart behandelter Blätter war mit 700—800 das niedrigste überhaupt, welches bisher erhalten worden war. Die „reinigende" Wirkung des Regens war also durch die 24stündige Wässerung noch übertroffen, der Vitamingehalt dagegen nicht beeinflußt worden. Diese Tatsache ließ die Vermutung aufkommen, daß die Blätter durch die Wässerung nicht nur äußerlich eine Reinigung erfahren hatten, indem sie von anhaftenden Schmutzteilchen befreit wurden, sondern daß auch wasserlösliche Stoffe aus dem Inneren des Blattes herausgelöst worden waren.

Eine Wässerung länger als 24 Stunden erwies sich nicht als zweckmäßig, da schon nach 48 Stunden trotz Zusatz von Toluol gegen Bakterienwirkung eine Abnahme des Reduktionsvermögens eingetreten war. Vier Tage lang gewässerte Blätter gaben Auszüge, die kaum noch Reduktionsvermögen besaßen.

Es wurden nun von äußerlich sauberen frischen und von 24 Stunden gewässerten Blättern vergleichende Bestimmungen der Trockensubstanz vorgenommen. Die zu wässernden Blätter wurden mit den anderen zusammen zunächst frisch eingewogen und dann über Nacht in Wasser suspendiert. Nach vorsichtigem Abtrocknen mit Filtrierpapier wurde das gewässerte Material in das zu seiner Einwage benutzte Wägegläschen zurückgegeben und gemeinsam mit der eingewogenen Menge Frischblätter 4 Stun-

den im Trockenschrank bei 100—105° getrocknet. Die Rückwägung ergab für die frischen Blätter eine Trockensubstanz von 42,0%, für die gewässerten Blätter von 38,1%, wodurch die gefundenen niedrigen Werte des scheinbaren Aequivalentgewichtes der Auszüge gewässerter Blätter eine Erklärung fanden.

Nun wurden mit Blattauszügen vom scheinbaren Aequivalentgewicht 700—800 erneut Versuche zur Reindarstellung des Vitamins unternommen. 2 l Blattauszug (10 g Blätter auf 100 ccm 2,2%iger Essigsäure) wurden im Vakuum unter Durchleiten von Stickstoff auf etwa 20 ccm Flüssigkeit eingedampft. Mit Anteilen des so gewonnenen dicken braunen Sirups wurden nacheinander verschiedene Fällungen vorgenommen, die Lösung nach jeder Fällung filtriert, und das Filtrat auf sein scheinbares Aequivalentgewicht hin geprüft. Ich versuchte zunächst wieder die Ausfällung störender Begleitstoffe mittels Aceton und 0,5%iger Bleiacetatlösung, ohne jedoch damit eine Verbesserung des scheinbaren Aequivalentgewichtes erreichen zu können. Ferner wurde eine 5%ige Eiweißlösung benutzt, die besonders starke Ausfällungen der Begleitstoffe ermöglichte und sich insofern als günstiges Fällungsmittel erwies, als sie das Reduktionsvermögen des Auszugs nicht schädigte. Die durch Eiweißfällung ausgeschiedenen Substanzen wurden durch die Zentrifuge abgetrennt. Da nun in der von der Fällung filtrierten Flüssigkeit Eiweiß gelöst vorlag, so war die nächste Aufgabe, dieses Eiweiß auszufällen, möglichst ohne das Reduktionsvermögen zu schädigen. Ich habe die Lösung nun unter Ueberleiten von Stickstoff im Wasserbad erhitzt, wobei koaguliertes Eiweiß ausfiel, das abfiltriert wurde. Bei erneutem Erhitzen des Filters fiel wieder Eiweiß aus, bis die Lösung nach mehrmaligem Erhitzen und Filtrieren endlich von Eiweiß frei war. Durch dieses lange Erhitzen hatte jedoch ihr Reduktionsvermögen so stark gelitten, daß die Weiteraufarbeitung eines so behandelten Auszuges nicht mehr von Bedeutung sein konnte.

Eine sofortige Gesamtfällung des gelösten Eiweißes wurde durch Zusatz von einigen Tropfen 0,5%iger Bleiacetatlösung erreicht, wobei jedoch ebenfalls zu erhebliche Verluste an Reduktionsvermögen eintraten.

Um etwa einen Teil der die Ascorbinsäure begleitenden Stoffe von vornherein ausscheiden zu können, habe ich zur Darstellung von Blattauszügen noch organische Lösungsmittel benutzt. Hierbei zeigte sich, daß z. B. Aceton und Methanol, heiß und kalt verwendet, Auszüge mit sehr hohem scheinbaren Aequivalentgewicht (4—8000) abgaben, was wahrscheinlich durch die Gegenwart des gleichfalls gelösten Chlorophylls bedingt war. Das Chlorophyll mußte nun erst wieder mit Aether unter Zusatz von Wasser ausgeschüttelt werden. (Die so gewonnenen Flüssigkeiten gaben mit Eiweißlösung keine Fällung).

Sodann wurde ein Gemisch von 60 Teilen Aceton und 40 Teilen n/10-Schwefelsäure kalt und heiß als Lösungsmittel verwendet, aber ebenfalls keine besseren Ergebnisse erzielt.

Ich habe nun noch versucht, die Blätter mit einem der wichtigsten Fällungsmittel, mit 0,5%iger Bleiacetatlösung auszulaugen, konnte aber auch hierbei keinen brauchbaren Auszug erhalten.

IV. Über die Haltbarkeit von Vitamin C.

a) Schützender Einfluß von Blattgewebe auf das Reduktionsvermögen von Blattauszügen.

Bei den Versuchen zur Reindarstellung von Vitamin C aus Birkenblättern war festgestellt worden, daß gekochte und kalt hergestellte essigsaure Auszüge eine verschieden lange Haltbarkeit ihres Reduktionsvermögens zeigten. Dieses verschiedene Verhalten sollte nun näher untersucht werden.

Es wurden nebeneinander aus jeweilss 10 g fein geschnittenen Birkenblättern und 100 ccm 2,2%iger Essigsäure Auszüge hergestellt, indem die Blätter einmal 10 Minuten gekocht, im anderen Falle 3 Stunden in kalter Essigsäure suspendiert wurden. Proben beider von den Blattstücken filtrierten Lösungen wurden in längeren Zeitabständen innerhalb 24 Stunden mit n/1000-Dichlorphenolindophenol-Lösung titriert, wobei folgendes festgestellt werden konnte:

Die Kochauszüge behielten mehrere Stunden lang ihr volles Reduktionsvermögen und besaßen nach 24stündigem Stehen unter Stickstoff noch die Hälfte des anfangs festgestellten Ascorbinsäuregehaltes.

Die Kaltauszüge, die nach 3stündigem Stehen unter Stickstoff ihren Höchstverbrauch an Farbstofflösung gezeigt hatten, ließen schon nach wenigen weiteren Stunden eine deutliche Abnahme ihres Reduktionsvermögens erkennen. Nach 24 Stunden war in ihnen kaum noch Ascorbinsäure nachzuweisen.

Die beobachtete verschieden lange Haltbarkeit heiß und kalt hergestellter Blattauszüge gleicher Konzentration konnte nur dahin erklärt werden, daß zugleich mit den Blättern Stoffe in die Lösung gelangten, die einen zerstörenden Einfluß auf die Ascorbinsäure auszuüben vermochten, die aber durch das Kochen teilweise vernichtet worden waren. Da der Luftsauerstoff nicht schädigend einwirken konnte, so mußte es sich bei dieser Oxydation um die Wirkung von Substanzen handeln, die bereits in den Blättern vorhanden waren, aber erst bei deren Verletzung durch Schneiden in kleine Stücke wirksam werden konnten. Es war anzunehmen, daß es sich bei diesen Substanzen um Oxydationsfermente (Oxydasen) handeln mußte. Ihr Einfluß auf Vitamin C soll später noch ausführlich behandelt werden (s. S. 32).

Bei den Versuchen zur Reindarstellung von Vitamin C war nun weiter festgestellt worden, daß Blätter, die etwa 24 Stunden in Wasser gelegen hatten und dann mit Essigsäure ausgezogen wurden, eine bedeutend geringere Trockensubstanz besaßen als die frischen Blätter. An den Auszügen, die aus gewässerten Blättern hergestellt worden waren, konnte nun eine weitere interessante Erscheinung festgestellt werden. Während nämlich ein Kochauszug, nach oben genannter Ausführung hergestellt und von den Blattresten filtriert, nach 24stündigem Stehen einen Abfall des Reduktionsvermögens von etwa 50% zeigte, hatte ein anderer Teil dieses Auszuges, in dem die mitgekochten Blattstücke verblieben waren, innerhalb von 24 Stunden fast sein gesamtes Reduktionsvermögen behalten. Diese Erscheinung war um so auffälliger, als der Auszug mit den Blattstücken nicht unter Stickstoff aufbewahrt worden war. Nach 40 Stunden betrug sein Reduk-

tionsvermögen immer noch 75%, nach 140 Stunden noch 15% des anfangs titrierten Wertes, während der Ascorbinsäuregehalt des gleich nach dem Kochen filtrierten Auszuges längst zerstört war.

Ich habe nun die verschieden lange Haltbarkeit der verschiedenen Blattauszüge näher untersucht und dabei folgende Tatsachen feststellen können:

Kochauszüge, die aus frisch gepflückten Birkenblättern hergestellt worden waren, besaßen nach 24stündigem Stehen an der Luft nur noch 20% ihres ursprünglichen Reduktionsvermögens. Die gleichen Auszüge, denen einige mitgekochte Blätter zugesetzt waren, hatten mit 35% etwas mehr Reduktionsvermögen behalten. Diese Kochauszüge, mit Blattstücken versetzt, die durch 3stündiges Suspendieren in Essigsäure kalt ausgezogen worden waren, hatten nach 24 Stunden ebenfalls noch 20% des ursprünglich vorhandenen Reduktionsvermögens erhalten.

Kalt hergestellte Blattauszüge zeigten, ob sie nun mit den kalt extrahierten Blattstücken versetzt wurden, aus welchen sie gewonnen worden waren, oder mit gekochten Blattstücken des vorher genannten Versuches, oder ob sie ohne Blattzusatz blieben, innerhalb 24 Stunden einen gleich starken Abfall des Reduktionsvermögens auf 8—10% des ursprünglich vorhandenen Ascorbinsäuregehaltes.

Nun wurden mit 24 Stunden gewässerten Blättern die gleichen Versuche angesetzt, wobei sich folgendes feststellen ließ:

Kalt hergestellte Auszüge ohne Blattzusatz verloren innerhalb von 24 Stunden ihr Reduktionsvermögen bis auf 7%; die Feststellung eines ähnlich starken Abfalls auf 13% wurde mit zugesetzten kalt extrahierten Blattstückchen gemacht. Dagegen zeigten zugesetzte gekochte Blattstücke eine Erhaltung von 50% des ursprünglich vorhandenen Reduktionsvermögens.

Der Kochauszug von gewässerten Blättern bewahrte ohne Blattzusatz und mit zugesetzten kalt extrahierten gewässerten Blattstücken ein gleich hohes Reduktionsvermögen von 19—21% des ursprünglichen Wertes. Dagegen blieb im Kochauszug von gewässerten Blättern, dem einige mitgekochte Blattstücke zugesetzt waren, innerhalb 24 Stunden fast das gesamte ursprüngliche Reduktionsvermögen (90%) erhalten.

Die beiden letzten Versuche mit gewässerten gekochten Blättern zeigten deutlich deren erhaltende Wirkung auf das Reduktionsvermögen der aus ihnen und anderen Blättern hergestellten Auszüge. Diese Tatsache gibt zu der Vermutung Anlaß, daß sich im gewässerten und gekochten Blattgewebe Substanzen befinden, die eine natürliche zerstörende Wirkung durch Stoffe etwa oxydierender Natur zu hemmen vermögen. Um die Wirkung eines Antiferments gegen Oxydasen kann es sich hierbei nicht handeln, da in den gekochten Blättern die bei 70—80° empfindlichen Oxydationsfermente vollkommen zerstört sein müssen. Dagegen kann es sich um eine Gegenwirkung auf die von den Oxydasen gebildeten Primärprodukte vom o-Chinon-Typus handeln, die von A. Szent-Györgyi (4) als die Zerstörer der Ascorbinsäure vermutet werden (s. S. 33).

Die vermuteten Antikörper müssen Stoffe sein, die nicht wasserlöslich sind, da sonst auch die erhaltende Wirkung bei den blattfreien Auszügen hätte festgestellt werden müssen.

Blattauszüge, die mit Alkohol und Aceton zur Herauslösung der „schützenden" organischen Substanz hergestellt worden waren, konnten mit Dichlorphenolindophenollösung nicht auf die Haltbarkeit ihres Reduktionsvermögens geprüft werden, da gleichzeitig Chlorophyll mit in Lösung ging, welches durch seine intensive Eigenfärbung die Titration nicht ermöglichte.

Nachfolgend sind die bei der Einwirkung der verschieden behandelten Blätter auf Auszüge beobachteten Haltbarkeiten des Reduktionsvermögens zusammengestellt:

Nicht gewässerte Blätter	Reduktionsvermögen nach 24 Stunden
Kaltauszug ohne Blätter	8%
„ m. gekochten Bl.	10%
„ m. kalt extrah. Bl.	10%
Kochauszug ohne Blätter	20%
„ m. gekochten Bl.	35%
„ m. kalt extrah. Bl.	20%
Gewässerte Blätter	
Kaltauszug ohne Blätter	7%
„ m. gekochten Bl.	50%
„ m. kalt extrah. Bl.	13%
Kochauszug ohne Blätter	21%
„ m. gekochten Bl.	90%
„ m. kalt extrah. Bl.	19%

b) Schützender Einfluß von Blattgewebe auf wässrige Ascorbinsäurelösungen.

Da verschieden behandeltes Blattgewebe einen schützenden bzw. zerstörenden Einfluß auf die aus ihm hergestellten Auszüge gezeigt hatte, war weiter die Frage von Interesse, ob diese Einwirkungen auch bei Auszügen von gewässerten Blättern, denen eine wässrige Ascorbinsäurelösung zugesetzt war, in Erscheinung traten.

Ich habe zu je 5 ccm Kochauszug von gewässerten Blättern 10 ccm einer Ascorbinsäurelösung von bekanntem Gehalt gegeben und diesem Gemisch wieder gewässerte, kalt und heiß ausgezogene Blattstücke zugesetzt. Als Vergleichsversuche dienten ein Ansatz von Ascorbinsäure, einmal in gewöhnlichem destilliertem Wasser, dann in gekochtem destilliertem Wasser gelöst, sowie ein Gemisch von Blattauszug und Ascorbinsäurelösung in oben genanntem Verhältnis ohne Blattzusatz. Die Titrationen der Lösungen zu Beginn des Ansatzes und nach 24stündigem Stehen ergaben folgende Werte:

Reine Ascorbinsäure, in ungekochtem wie gekochtem einfach destillierten Wasser gelöst, zeigte nach 24 Stunden jeweils noch 42% des ursprünglich vorhandenen Reduktionsvermögens; der Kochauszug mit Ascorbinsäurelösung ohne Blattzusatz hatte sich mit 48% verbliebenem Reduktionsvermögen ähnlich verhalten. Dagegen besaß das Gemisch aus Koch-

auszug und Ascorbinsäurelösung, dem gekochte gewässerte Blattstücke zugesetzt worden waren, noch 86% des anfangs titrierten Wertes, während das Gemisch, welches mit kalt extrahierten gewässerten Blättern versetzt worden war, mit verbliebenen 6% Redukionsvermögen am stärksten abgefallen war:

	Reduktiosvermögen nach 24 Stunden
Ascorbinsäure, in ungekochtem dest. H_2O	42%
„ „ gekochtem „ H_2O	42%
Kochauszug + Asc.-Lg. ohne Blätter	48%
„ + „ „ m. gekochten Bl.	86%
„ + „ „ m. kalt extrah. Bl.	6%

Es zeigte sich also bei diesen Versuchen mit Gemischen von Blattauszügen und Ascorbinsäurelösungen das gleiche Bild wie bei reinen Auszügen gewässerter Blätter: die beste Haltbarkeit des Reduktionsvermögens wurde in jedem Falle bei Anwesenheit von gekochtem gewässertem Blattgewebe festgestellt; der Grad der Erhaltung war dabei mit 90 bzw. 86% verbliebenen Reduktionsvermögens ziemlich übereinstimmend.

c) Haltbarkeit wässriger Lösungen von reiner Ascorbinsäure.

Die beobachtete schützende Einwirkung von gewässertem und gekochtem Blattgewebe auf das Reduktionsvermögen wässriger Ascorbinsäurelösungen wurde nun auch durch andere anorganische und organische Substanzen zu ersetzen versucht. Es wurden wieder n/100-Lösungen von „Cebion" mit einfach destilliertem Wasser hergestellt und davon je 1 ccm in ein Reagenzglas gegeben. Zu diesen Lösungen wurde nun 1 ccm einer 0,1%igen primären Kaliumphosphatlösung, bzw. einer 0,1%igen Borsäurelösung zugefügt. Ferner wurde zu allen Versuchen 0,1 ccm Toluol gegeben, um den Einfluß von Bakterien auszuschalten. Es zeigte sich, daß nach 24stündigem Stehen die reinen Ascorbinsäurelösungen etwas mehr an Reduktionsvermögen verloren hatten, als diejenigen mit Zusätzen. Ein Zusatz von Glucosamin z. B. bewirkte dagegen einen schnelleren Abfall des Reduktionsvermögens, als an einer reinen Ascorbinsäurelösung festgestellt wurde.

Bei all diesen Versuchen konnte jedoch trotz teilweiser verbesserter Haltbarkeit der Ascorbinsäure die erhaltende Wirkung niemals soweit gesteigert werden, wie sie sich z. B. an einem Zitronensaft beobachten ließ.

Da sich nun im einfach destillierten Wasser noch Metallspuren, vor allem Kupfer, befinden können, deren zerstörender Einfluß auf Ascorbinsäure bekannt ist, habe ich nun eine Lösung von Ascorbinsäure in doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Wie die Titrationen über mehrere Stunden zeigte, konnte mit diesem Lösungsmittel eine enorme Steigerung der Haltbarkeit des Vitamins erzielt werden. In mehreren Versuchen wurde festgestellt, daß von reiner Ascorbinsäure, in doppelt destilliertem Wasser gelöst, nach 24 Stunden noch

84—91%, nach 48 Stunden noch 72—86% des ursprünglich vorhandenen Reduktionsvermögens erhalten geblieben war.

Ein Vergleichsversuch mit Zitronensaft ergab, daß damit dessen Haltbarkeit an Reduktionsvermögen noch übertroffen worden war.

d) Einfluß von Eiweiß und Aminosäuren auf die Haltbarkeit wässriger Ascorbinsäurelösungen.

Um die Erhaltung des Reduktionsvermögens wässriger Ascorbinsäurelösungen noch zu steigern, wurden diesen Lösungen kleine Mengen von Eiweiß zugesetzt, die schon bei früheren Versuchen von E. Gugath (3) eine gewisse Schutzwirkung auf das Vitamin ausgeübt hatten.

Da Pflanzen kleine Mengen von Eiweiß enthalten, so wurde zunächst auf die Einflüsse pflanzlichen Eiweißes geprüft. In 100 ccm einer 10%igen Ammonsulfatlösung wurde 0,1 g Legumin gelöst, und davon 1 ccm zu 5 ccm n/100-Ascorbinsäurelösung gegeben. Als Vergleichslösung dienten 5 ccm Ascorbinsäurelösung, denen 1 ccm Wasser zugesetzt war. Nach 24-stündigem Stehen zeigte sich, daß die mit Legumin versetzte Lösung etwas weniger haltbar gewesen war als die reine Ascorbinsäurlösung.

Mit dem Albumin der Milch, welches nach Abtrennen des Caseins heiß gefällt worden war, konnte ebenfalls keine verbesserte Haltbarkeit des Reduktionsvermögens erzielt werden. Bemerkenswert war, daß das nach Abtrennen von Albumin gewonnene eiweißfreie Filtrat, von welchem 1 ccm zu 5 ccm Ascorbinsäurelösung gegeben wurde, das Reduktionsvermögen innerhalb 24 Stunden vollkommen zerstörte, und diese zerstörende Wirkung durch Zusatz von gefälltem Albumin z. T. wieder aufgehoben werden konnte.

Endlich untersuchte ich noch getrocknetes Eieralbumin, welches ebenfalls in Spuren zur Ascorbinsäurelösung zugesetzt wurde. Nach 24-stündigem Stehen der Lösung wurde festgestellt, daß dieser Zusatz die Haltbarkeit der Ascorbinsäure auf 97% gesteigert hatte, gegenüber 91% der reinen Vitaminlösung. Nach 48 Stunden besaß die mit Eiweiß versetzte Lösung noch 90%, die reine Ascorbinsäurelösung noch 86% ihres Reduktionsvermögens.

In der gleichen Versuchsordnung wurde nun noch auf die Einwirkung einzelner Aminosäuren geprüft. Hierbei zeigte sich, daß zugesetzte Spuren von Glycokoll, α-Alanin, Gluthaminsäure . HCl und l-Leucin das ursprünglich vorhandene Reduktionsvermögen stärker herabsetzten, als es bei reiner Ascorbinsäurelösung festgestellt wurde.

Dagegen bewirkten Phenylalanin und Cystin eine bessere Haltbarkeit gegenüber reiner Ascorbinsäurelösung.

Bei all diesen Versuchen, mit Ausnahme der Untersuchungen reiner wässriger Ascorbinsäurelösung, wurde 0,1 ccm Toluol zugesetzt. Diese Maßnahme erwies sich, wie die biologische Untersuchung ergab, vollkommen ausreichend als Schutz gegen Bakterien.

e) Leitfähigkeit und Oxydation wässriger Ascorbinsäurelösungen.

Es war weiter die Frage von Interesse, ob eine Lösung von reiner Ascorbinsäure in doppelt destilliertem Wasser, die bei genügender Be-

rührung mit Luftsauerstoff einer langsamen Oxydation anheimfällt, durch ihren Verlust an Reduktionsvermögen eine entsprechende Verschiebung ihrer Leitfähigkeit erfährt.

Als Versuchslösung diente wiederum eine ungefähr n/100-Ascorbinsäurelösung, von welcher während der Versuchsdauer 200 ccm in einem 500 ccm-Meßkolben aufbewahrt wurden, um eine genügende Berührung mit Luft vorauszusetzen. Diese Lösung wurde in Abständen von mehreren Tagen und Wochen mittels Dichlorphenolindophenol-Lösung titriert und gleichzeitig ihre Leitfähigkeit an der Wheatstoneschen Brücke gemessen. Dabei wurden folgende Werte erhalten:

Untersuchung nach	Farbstoffverbrauch (ccm n/1000-Lg.)	Leitfähigkeit $\left(\frac{1}{\text{Ohm}}\right)$
Ansatz	10,8	$1{,}75 \times 10^{-4}$
1 Tag	10,3	$1{,}68 \times 10^{-4}$
2 Tagen	9,8	$1{,}81 \times 10^{-4}$
20 „	5,5	$4{,}12 \times 10^{-4}$
40 „	—	$3{,}94 \times 10^{-4}$

Die Lösung der Ascorbinsäure in doppelt destilliertem Wasser hatte wiederum trotz großer Berührungsfläche mit Luft eine enorme Haltbarkeit gezeigt: nach etwa 3 Wochen waren noch mehr als 50% ihres ursprünglichen Reduktionsvermögens vorhanden.

Wie die zunehmende rote Färbung des einfließenden blauen Farbstoffes bei der Titration und die erhöhte Leitfähigkeit zeigte, wurde die p_H-Stufe der Lösung nach der sauren Seite verschoben.

V. Über die Einwirkung der Oxydationsfermente auf Vitamin C.

Während bei gekochten Blattauszügen immer eine verhältnismäßig gute Haltbarkeit des Reduktionsvermögens über 24 Stunden beobachtet worden war, hatten Auszüge, die mit kalter Essigsäure hergestellt worden waren, schon nach wenigen Stunden einen erheblichen Rückgang des Reduktionsvermögens gezeigt (s. S. 27). Bei der Feststellung dieser Tatsache wurde die Vermutung ausgesprochen, daß als Ursache dieses schnellen Verschwindens der Ascorbinsäure nur Oxydationsfermente in Betracht kommen könnten.

A) Oxydasen.

a) Allgmeines.

Nach Versuchen, die bis zum Jahre 1895 zurückgehen, kennt man im pflanzlichen und tierischen Organismus Stoffe, die eine oxydierende Wirkung

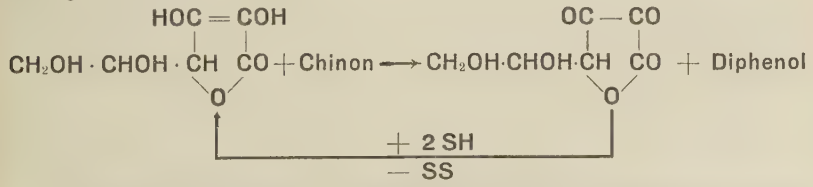
hervorzurufen vermögen, wenn sie mit Luftsauerstoff in Berührung kommen. Man bezeichnete sie als Oxydationsfermente oder Oxydasen und teilte sie, entsprechend ihrer spezifischen Einwirkung auf einwertige bzw. mehrwertige Phenole, in Monophenolase bzw. Polyphenolase ein; als drittes Oxydationsferment kam dann noch die Indophenolase hinzu, die aber nur auf NH_2-substituierte Körper einwirkt und fast nur im tierischen Organismus gefunden wird.

Die meisten Pflanzen enthalten nun neben Vitamin C Mono- und Polyphenolase in größeren Mengen. In der unverletzten Pflanze oder Frucht, zu deren Inneren Luftsauerstoff keinen Zutritt hat, können also diese Substanzen alle nebeneinander bestehen. Sobald aber die Pflanze verletzt wird, und die Oxydasen mit Luft in Berührung kommen, vermögen sie den molekularen Sauerstoff auf reduzierende Körper, also auch auf Ascorbinsäure zu übertragen, wodurch diese sehr schnell in ihrem Reduktionsvermögen geschädigt werden. Auf diese Einwirkung ist in erster Linie das schnelle Zurückgehen des Ascorbinsäuregehaltes pflanzlicher Pressäfte oder kalt hergestellter Blattauszüge zurückzuführen.

Nach A. Szent-Györgyi (4) sind nicht die Oxydasen selbst als die Träger der Oxydationswirkung auf Ascorbinsäure verantwortlich zu machen, sondern Produkte, die bei der Einwirkung von Oxydasen auf Phenole primär entstehen und den Typus von o-Chinonen besitzen. Szent-Györgyis Annahme gründet sich auf die Tatsache, daß o-Chinon-Körper (wie Benzochinon) mit reduzierenden Stoffen jedoch ohne Oxydasen die gleichen Färbungen ergeben, wie sie bei Anwesenheit dieser Fermente beobachtet werden. Er sieht weiter in den stark reduzierenden Stoffen der Pflanze, vor allem in Vitamin C, Substanzen, die Oxydasen- wie Peroxydasewirkungen aufzuheben vermögen. Nach seiner Ansicht reagieren sie mit den primär gebildeten o-Chinonen und verhindern daher bei verschiedenen Pressäften und angeschnittenen Pflanzenteilen das Auftreten von Dunkelfärbungen, wie wir sie z. B. bei dem Kartoffelpressaft beobachten (5).

A. Szent-Györgyi glaubte hieraus folgern zu können, daß das Fehlen von Oxydasen in sehr vitaminreichen Früchten nur scheinbar ist, indem nämlich geringe Mengen Oxydasen von viel Vitamin überdeckt und dadurch scheinbar unwirksam werden.

Der Reaktionsverlauf zwischen Ascorbinsäure und o-Chinon wird von ihm folgendermaßen angegeben:



Gleichzeitig anwesendes Glutathion vermag die oxydierte Ascorbinsäure leicht wieder zu reduzieren.

Die Art der Einwirkung der Oxydasen, bzw. der primären Oxydationsprodukte auf wässrige Lösungen von reiner Ascorbinsäure, sowie die

Hemmung dieser Einwirkungen soll im folgenden Abschnitt behandelt werden.

b) Nachweis von Monophenolase (Tyrosinase).

Nach Angaben von R. Chodat (6) bewirken kleine Mengen von p-Kresol und Aminosäuren zu Pilz-Tyrosinase gegeben eine gelborange bis rote Färbung, die auf Zusatz von weiteren Mengen Aminosäuren in blau übergehen soll. Ich habe nun diese Substanzen zum Nachweis der Tyrosinase in Kartoffelpressaft benutzt.

Gewaschene ungeschälte Kartoffeln wurden mit einer Reibe zerkleinert, das geriebene Produkt in einem Tuch abgepreßt und der so erhaltene Kartoffelsaft durch Zentrifugieren von Stärke und anderen Substanzen möglichst befreit. Das Ausgangsprodukt für die folgenden Versuche war dunkelbraun gefärbt und etwas trübe.

Zu je 1 ccm dieses Pressaftes wurden nun wechselnde Mengen einer 0,1%igen p-Kresol- und 0,1%igen Alaninlösung gegeben. Die Reaktion der Rotfärbung war nach 45 Minuten Einwirkungsdauer noch auf Zugabe von je 3 Tropfen der beiden Lösungen gut sichtbar. 3 Tropfen entsprachen dabei 0,15 mg p-Kresol bzw. Alanin. Mit geringeren Konzentrationen der Reagenzien, je 1—2 Tropfen der beiden Lösungen, konnte keine Färbung des Pressaftes mehr erzielt werden. Dagegen ließ sich feststellen, daß die Intensität der auftretenden Färbungen mit zunehmenden Mengen p-Kresol und Alanin von hellrot bis tiefrot gesteigert werden konnte, während andererseits die Reaktionsdauer bis zum Auftreten der Färbungen von 45 auf etwa 10 Minuten herabsank. Die beobachteten Färbungen traten immer als Farbkranz an der Oberfläche der Flüssigkeit auf.

Die von R. Chodat bei dieser Reaktion festgestellte Blaufärbung bei einem überschüssigen Zusatz von Aminosäure konnte am Kartoffelpressaft nicht beobachtet werden. Ich erhielt in diesem Falle dunkelgrüne Färbungen, die wohl durch die braune Eigenfärbung des Kartoffelpressaftes in Verbindung mit einer entstehenden Blaufärbung verursacht worden sind.

c) Nachweis von Polyphenolase.

Als genauen Nachweis der Polyphenolase führt A. Bach (7) das Purpurogallin an, welches in Aceton oder Aether gelöst und mit dem dreifachen Volumen Wasser verdünnt, auf Zusatz des Fermentes eine prachtvolle violette Färbung annimmt. Diese Färbung verschwindet allmählich und wird durch eine braune ersetzt. Mit Hilfe dieser Reaktion hat A. Bach noch 1 Teil Purpurogallin in 500 000 Teilen Flüssigkeit nachzuweisen vermocht.

Zum Nachweis von Polyphenolase in Kartoffelpressaft habe ich eine Lösung von etwa 10 mg Purpurogallin in 20 ccm Aceton hergestellt, mit 60 ccm verdünnt und zu je 1 ccm dieser Lösung 1 ccm Kartoffelpressaft tropfenweise zugegeben. Nach kurzer Zeit nahm die Flüssigkeit eine blaugraue Farbe an. Bei Aufsicht war eine schwache bläuliche Fluoreszenz zu erkennen, während in der Durchsicht die braune Farbe des Pressaftes vorherrschte. Nach etwa 30 Minuten war dieser Farbeffekt wieder verschwunden; die Flüssigkeit war nun wieder braun gefärbt.

d) Einwirkung der Oxydasen auf Ascorbinsäure.

Es sollte nun das Verhalten reiner Ascorbinsäure gegen Oxydasen geprüft werden, wobei die Frage von Interesse war, inwieweit diese oxydierende Einwirkung der Fermente durch Kälte und Hitze beeinflußt werden könnte. Da die Kartoffel sehr reich an Oxydasen ist, wurden deren Pressäfte in ihrer Einwirkung auf Ascorbinsäure untersucht.

Um die Reaktion zwischen Oxydasen und Vitamin C innerhalb weniger Stunden meßbar erfassen zu können, mußte zunächst ein bestimmtes Mengenverhältnis der beiden Substanzen festgelegt werden. Nach mehreren Vorversuchen erwies sich für eine vollständige Oxydation der Ascorbinsäure innerhalb 1—2 Stunden folgendes Verhältnis als günstig:

1 ccm Ascorbinsäurelösung wurde mit 0,1 ccm Kartoffelpressaft versetzt, wobei es jedoch notwendig war, daß der Luft eine große Berührungsfläche geboten wurde. Ich habe diese Versuche deshalb in einem 50 ccm-Erlenmeyer ausgeführt, nachdem Vorversuche im Reagenzglas wegen zu geringer Oberfläche nur eine langsame Zerstörung der Ascorbinsäure ermöglicht hatten.

Als Ausgangsmaterial wurden Kartoffelpressäfte nach oben beschriebener Herstellung benutzt, deren p_H zwischen 5,7 und 6,1 lag, und eine ungefähr n/100-Ascorbinsäurelösung. Beide Stoffe wurden im Verhältnis 1 : 10 in mehrere Erlenmeyer gegeben und in Abständen von 30 bzw. 15 Minuten mit Dichlorphenolindophenollösung titriert. Für die Reaktionstemperatur 19—20° war das Reduktionsvermögen im allgemeinen nach 60—75 Minuten Einwirkungsdauer verschwunden.

Nach Untersuchungen von H. S. Raper (8) werden die Oxydasen durch tiefe Temperaturen (bis — 20°) nicht beeinflußt.

Ich habe nun zunächst vergleichsweise Kartoffelpressaft und Ascorbinsäurelösung bei Zimmertemperatur (19—20°) und bei Eisschranktemperatur (ungefähr 5—6°) aufeinander einwirken lassen und dabei feststellen können, daß die Fermente schon durch diese Kühlung sehr stark in ihrem oxydierenden Einfluß auf Ascorbinsäure gehemmt wurden.

Anschließend wurde die Wirksamkeit der Oxydasen auf ihre Abhängigkeit von Temperaturen oberhalb 20° untersucht. Hierzu wurden jeweils einige ccm Kartoffelpressaft auf 30, 40, 50 . . . 98° erhitzt, indem sie 30 Minuten in ein entsprechend temperiertes Wasserbad eingestellt wurden. Nach Abkühlung wurden hiervon je 0,1 ccm zu 1 ccm Ascorbinsäurelösung gegeben. Der Grad der Inaktivierung der Oxydasen durch die Hitze konnte nun an der Geschwindigkeit des Rückganges des Reduktionsvermögens gemessen werden. Im Vergleichsversuch wurde die Einwirkung unerhitzten Kartoffelpressaftes festgestellt. Hierbei zeigte sich zunächst, daß die Pressäfte, die aus verschiedenen Knollen gewonnen worden waren, eine verschieden starke Einwirkung auf Ascorbinsäure hatten. Es zeigte sich weiter, daß der Kartoffelpressaft innerhalb weniger Stunden an Oxydationswirkung verlor, wenn er mit Luft in Berührung war. Um also zu vergleichenden Ergebnissen zwischen den einzelnen Erhitzungsversuchen zu gelangen, mußte für die gesamte Versuchsreihe mit verschiedenen Temperaturen der Pressaft ein und derselben Kartoffel benutzt werden. Ich habe, da die Versuchsreihe mit mehreren Temperatursteigerungen einige Stunden in Anspruch

nahm, den Pressaft unter Stickstoff gesetzt, wodurch er seine völlige Oxydationsfähigkeit bis zum anderen Tage behielt.

Die Erhitzungsversuche ergaben folgende Befunde:

Nach 30minütigem Erwärmen des Kartoffelpressaftes auf 30, 40, 50 und 60° war die Wirksamkeit seiner Oxydasen nicht gehemmt worden. Beim Erwärmen auf 70° zeigten sich die ersten hemmenden Wirkungen, indem die Oxydation der vorgelegten Ascorbinsäure statt 75 schon 90 Minuten in Anspruch nahm. Beim Erhitzen auf 75, 80 und 90° sowie Siedetemperatur (98°) war innerhalb von 90 Minuten nur noch eine Oxydationswirkung von 20 bzw. 10% gegenüber unerhitztem Kartoffelpressaft festzustellen.

Um die oxydierende Wirkung vollkommen ausschalten zu können, habe ich nun den Kartoffelpressaft 1—2 Stunden im Wasserbad am Rückflußkühler gekocht. Nach Zugabe dieses Pressaftes zu Ascorbinsäure zeigte sich folgendes:

Nach 60 Minuten Einwirkungsdauer war zunächst noch keine Schädigung des Reduktionsvermögens zu bemerken; nach 120 Minuten stellte ich dann einen Abfall des Reduktionsvermögens um 10% fest, der sich während weiteren 120 Minuten nicht änderte. Nach 20 Stunden Reaktionsdauer waren 80% des ursprünglich vorhandenen Reduktionsvermögens zerstört.

Da die wässrige Ascorbinsäurelösung schon durch Berührung mit Luft (besonders bei großer Oberfläche) geschädigt wird, wurde ein Vergleichsversuch mit reiner Ascorbinsäurelösung angesetzt, wobei nach 20 Stunden ein Verlust an Reduktionsvermögen von 36% festgestellt wurde, nachdem sich während weniger Stunden Lufteinwirkung die Ascorbinsäuremenge kaum verändert hatte.

Die Differenz von 44% Verlust an Reduktionsvermögen mußte also noch als Wirkung des Kartoffelpressaftes angesehen werden. Da nun durch das zweistündige Erhitzen keine Oxydasen mehr vorhanden waren, konnten nur noch die von den Oxydasen gebildeten Primärprodukte vom Typus der o—Chinone die Träger der oxydierenden Einwirkung sein, was die Annahme Szent-Györgyis bestätigen würde.

Mit Hilfe der oben angegebenen Nachweisreaktion für Oxydasen sollte nun festgestellt werden, bei welchen Temperaturen der Tyrosinase bzw. Polyphenolase die Möglichkeit genommen wird, die oxydierenden Primärprodukte zu bilden.

Ein Kartoffelpressaft wurde wie vorher auf verschiedene Temperaturen erhitzt und teils mit p-Kresol und Alanin, teils mit Purpurogallin versetzt. Dabei ließ sich feststellen, daß bei 30minütigem Erwärmen auf 65° noch Polyphenolase anwesend, daß sie dagegen bei 70° zerstört war. Die Tyrosinase ließ sich nach Erwärmen auf 70 und 75° noch gut nachweisen und war bei 80° zerstört. Bei diesen Farbreaktionen war bemerkenswert, daß die Intensität der Färbungen immer mehr abnahm, je mehr man sich der Hemmungstemperatur näherte. Dagegen war die Geschwindigkeit ihres Auftretens immer die gleiche.

Der Ausfall der Farbreaktionen zeigt Uebereinstimmung mit der bei der Einwirkung auf Ascorbinsäure für die Oxydasen gefundenen Hemmungs-

temperatur von 70—80°. Die Zerstörung der Ascorbinsäure über diese Temperatur hinaus konnte also nur noch von den Primärprodukten herrühren.

B. Peroxydase.

Die Peroxydase kommt neben den Oxydasen ebenfalls weit verbreitet in Pflanzen vor. Sie unterscheidet sich jedoch insofern von dem Wirkungsmechanismus der eigentlichen Oxydationsfermente, als sie ihre Oxydationswirkung auf reduzierende Körper nur dann entfalten kann, wenn gleichzeitig Wasserstoffperoxyd anwesend ist. Da über die Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd in Blättern und Kartoffeln nichts bekannt ist, so ist bei den vorausgehenden Versuchen die Einwirkung dieses Fermentes nicht beachtet worden. Wenn nun die Peroxydase in ihrer Einwirkung auf Ascorbinsäure im Anschluß an die Versuche mit Oxydasen behandelt werden soll, so geschieht dies vornehmlich im Hinblick auf Versuche, die schon früher einmal von H. Dick (9) gemacht worden sind, sowie auf Grund von Beobachtungen, die ich im Laufe meiner Untersuchungen mit Blättern und Kartoffeln an diesem Ferment gemacht habe.

a) Nachweis und Hemmung der Peroxydase.

Zum Nachweis der Peroxydase in Birkenblättern wurden p-Phenylendiamin und Bariumperoxyd benutzt, die als Storchsches Reagenz bei Milch zum Nachweis des Ferments dienen.

Zu einigen feingeschnittenen Blättern wurden einige ccm Wasser gegeben, das Ganze gut geschüttelt und dann p-Phenylendiamin und Bariumperoxyd in fester Form zugegeben, wobei sofort eine tiefe blau-violette Färbung auftrat, wie man sie in gleicher Weise bei der Rohmilch beobachtet. Gekochte Blätter und Blattauszüge dagegen gaben diese Farbreaktion nicht mehr.

Ein Kartoffelpressaft, der durch Reiben der Knollen, Abpressen und Zentrifugieren gewonnen worden war, zeigte ebenfalls sofort diese Blaufärbung. Die Färbung wurde allerdings schon nach kurzer Zeit von der braunen Eigenfarbe des Pressaftes überdeckt.

Ich habe nun zu der an frischen Blättern oder frischem Kartoffelpressaft erzeugten Blaufärbung sofort Ascorbinsäure zugegeben, worauf die Färbung sogleich verschwand. An Färbungen, die schon einige Minuten gestanden hatten, konnte diese Reduktion mit Ascorbinsäure nicht mehr vorgenommen werden. Mit Hilfe von Ascorbinsäure wurde dann ebenfalls die bei der Rohmilch mit p-Phenylendiamin und Bariumperoxyd entstandene Blaufärbung rückgängig gemacht, was für die Identität der bei den verschiedenen Produkten auftretenden Färbungen spricht.

Um die Temperatur feststellen zu können, bei der die Peroxydase unwirksam wird, wurden Kartoffelpressäfte 15 Minuten lang im Wasserbad auf Temperaturen zwischen 70 und 100° erhitzt. Die Lösungen wurden dann abgekühlt und sofort mit den Peroxydasereagenzien versetzt. Dabei zeigte sich folgendes.

Nach Erwärmen auf 70° trat, nur etwas langsamer als an unerhitztem Pressaft, eine schön sichtbare Blaufärbung auf, da der erhitzte Pressaft eine geringere Eigenfärbung besaß. Bei 75° trat eine weitere Verzögerung im Auftreten der Färbung ein. Beim Erhitzen auf 80° und höhere Temperaturen blieb die Blaufärbung aus; die Peroxydase war zerstört.

Während also die Polphenolase bei 70° und die Tyrosinase zwischen 75 und 80° zerstört wurde, war die Peroxydase erst bei 80° unwirksam geworden. Diese Werte gelten für die Fermente der Kartoffel.

b) Einwirkung von Peroxydase + Wasserstoffperoxyd auf Ascorbinsäure.

Bei seinen Untersuchungen von Oxydationsmitteln in ihrer Einwirkung auf das Reduktionsvermögen des Vitamins C hat H. Dick auch das Wasserstoffperoxyd geprüft. Zu gepufferten Zitronensäften wurde 3%iges Wasserstoffperoxyd in verschieden großen Mengen gegeben und bei verschiedenen Temperaturen der Ablauf der Einwirkung durch Titration mit Dichlorphenolindophenol in kurzen zeitlichen Abständen festgestellt. H. Dick kam zu dem Ergebnis, daß die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd auf Vitamin C bei Zimmertemperatur verhältnismäßig gering ist und von der Menge des im Ueberschuß zugesetzten Wasserstoffperoxyds wenig beeinflußt wird; daß dagegen die Einwirkung bei Temperaturen um 100° sehr stark ist.

Ich habe nun zunächst entsprechende Versuche mit einer wässrigen Lösung von reiner Ascorbinsäure (ungefähr n/100) und gleichen Mengen 3%igen Waserstoffperoxyds vorgenommen und innerhalb kurzer Zeit (5 Minuten) keine Schädigung des Reduktionsvermögens feststellen können. Es ist anzunehmen, daß die von H. Dick während dieser Zeit beobachtete Abnahme des Reduktionsvermögens nicht durch das Wasserstoffperoxyd selbst, sondern durch den in diesem frei vorhandenen Sauertoff hervorgerufen worden ist. Unter Umständen hat es sich vielleicht auch bei den Dickschen Versuchen um eine Peroxydasewirkung gehandelt.

Nachdem reines Wasserstoffperoxyd innerhalb kurzer Zeit keine Einwirkung auf Ascorbinsäure gezeigt hatte, wurde der gleiche Versuch über dieselbe Zeitdauer mit Ascorbinsäure, Wasserstoffperoxyd und Kartoffelpressaft (als Träger der Peroxydase) angesetzt, wobei folgendes festgestellt werden konnte:

Sofort nach Zusammengabe der Substanzen trat eine starke Schaumbildung durch freiwerdenden Sauerstoff auf. Von dem ursprünglich vorhandenen Reduktionsvermögen konnten nach 5 Minuten nur noch etwa 25% festgestellt werden.

Bei dieser Versuchsanordnung konnte allerdings nicht bewiesen werden, ob der bei der Reaktion frei werdende Sauerstoff nicht auf die Leukoform des Farbstoffes rückoxydierend eingewirkt und so nur eine Oxydation der Ascorbinsäure durch Peroxydase + Wasserstoffperoxyd vorgetäuscht hatte.

Ich habe daher die oxydierende Einwirkung von Wasserstoffperoxyd und Kartoffelpressaft, sowie eines Gemisches von beiden auf den reduzierten

Farbstoff geprüft. Eine Ascorbinsäurelösung wurde mit einer nicht ganz ausreichenden Farbstoffmenge versetzt, sodaß die Lösung intensiv gelb gefärbt war. Zu dieser Lösung wurde nun ein Tropfen Wasserstoffperoxyd gegeben, wodurch keine Aenderung zu bemerken war. Anschließend wurde ein Tropfen Kartoffelpressaft zugegeben, der sofort eine tiefblaue Färbung verursachte. Ein Tropfen Kartoffelpressaft allein zu einer nahezu austitrierten Ascorbinsäurelösung gegeben, erzeugte ebenfalls eine blaue Färbung, die aber nicht so schnell und intensiv gefärbt wie die vorhergehende auftrat.

Im ersteren Falle hatte also die Peroxydase gemeinsam mit Wasserstoffperoxyd die Rückbildung des blauen Farbstoffes verursacht, im zweiten Falle die ebenfalls anwesenden Oxydasen gemeinsam mit den Luftsauerstoff, bzw. die primär gebildeten o-Chinone.

Mit Hilfe der Farbstofftitration war also die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd auf Ascorbinsäure bei Anwesenheit von Peroxydase nicht zu erfassen.

VI. Wechselwirkungen zwischen Vitamin C und anderen Vitaminen.

Im Zusammenhang mit meinen Versuchen über die Erhaltung und Schädigung der Ascorbinsäure interessierte der zerstörende Einfluß von einzelnen Vitaminen auf Vitamin C der im Organismus vielfach beobachtet worden sein soll.

Nach Versuchen von F. G. Hopkins, Mouriquand, Michel und von Euler (10) wurde z. B. festgestellt, daß bei Kindern dann Skorbut auftrat, wenn ihnen Lebertran mit Fruchtsäften gemischt verabreicht wurde. Ferner konnte beobachtet werden, daß die antiskorbutische Wirksamkeit von Vitamin C durch die Anwesenheit von Vitamin A völlig aufgehoben werden kann. Für mich war nun die Frage von Interesse, ob diese zerstörenden Einflüsse der Vitamine D und A auf C auch rein chemisch zu erkennen seien.

Ich habe daher im Reagenzglas Lösungen der genannten Vitamine zusammengegeben, den ursprünglich vorhandenen Gehalt an Ascorbinsäure mittels einer n/1000-Lösung von Dichlorphenolindophenol festgestellt, und die Stoffe längere Zeit aufeinander einwirken lassen.

Zunächst wurde eine absolut alkoholische Lösung des Vitamin A-Präparates „Vogan" mit einer absolut alkoholischen Lösung von Vitamin C zusammengegeben: 3 Tropfen „Vogan" in 2 ccm Alkohol zu 2 ccm Ascorbinsäurelösung. Die Titrationswerte, in ccm n/1000-Farbstofflösung ausgedrückt, waren:

nach	Ascorbins.-Lg.	Ascorbins.-Lg. + Voganlg.
30 Minuten	18,3	18,5
60 „	18,8	18,6
90 „	18,7	18,3
16 Stunden	17,3	17,3

Im Reagenzglas ließ sich also kein schädigender Einfluß von Vitamin A auf C feststellen. (Die in beiden Versuchsreihen beobachtete gute Haltbarkeit der Ascorbinsäure ist auf die absolut alkoholische Lösung zurückzuführen).

Als nach 16 Stunden zu beiden Versuchsreihen einige ccm einfach destillierten Wassers zugesetzt wurden, trat binnen kurzer Zeit ein gleichmäßiger Abfall des Reduktionsvermögens ein.

Bei der Untersuchung von Vitamin D in seiner Einwirkung auf Ascorbinsäure wurde 1 ccm „Vigantol" (0,3 mg Vitamin D) in Aceton gelöst und zu 2 ccm einer Lösung von Vitamin C gegeben. Als Vergleichsversuch diente wieder eine reine Ascorbinsäurelösung. Auch hier blieben die Werte der Titration konstant, und dann trat ebenfalls auf Zusatz von Wasser ein gleichmäßiger Abfall des Reduktionsvermögens ein, der in beiden Versuchen übereinstimmte. Also auch das Vitamin D zeigte in chemischer Hinsicht keine Beeinflussung der Wirksamkeit der Ascorbinsäure.

Ferner wurde noch die Einwirkung der Vitamine des B-Komplexes auf C, die auch klinisch von Bedeutung sein soll, untersucht. Anstelle reiner Substanzen wurden Hefeextrakte verwendet, die die gewünschten B-Vitamine in ausreichendem Maße enthalten.

Zunächst wurde ein etwa 10%iger wässriger Hefeextrakt mit der gleichen Menge n/100 wässriger Ascorbinsäurelösung zusammengegeben. An Titrationswerten (ccm n/1000-Dichlorphenolindophenol-Lösung) wurden erhalten:

nach	Ascorbins.-Lg.	Ascorbins.-Lg. + Hefeextr.
60 Minuten	14,4	13,3
100 „	12,1	13,1
150 „	6,8	6,2
24 Stunden	—	—

Der Abfall des Reduktionsvermögens der Ascorbinsäure war also ganz normal eingetreten, ohne durch die Anwesenheit des Hefeextraktes beeinflußt worden zu sein.

Der gleiche Versuch wurde mit einem etwa 10%igen alkoholischen Hefeextrakt und alkoholischer Ascorbinsäure angesetzt und ergab insofern eine Abweichung der Titrationswerte, als durch den Alkohol aus der Hefe Stoffe herausgelöst worden waren, die ebenfalls Farbstoff, wenn auch ziehend, reduzierten. Es mußte sich hierbei besonders um Glutathion handeln, dessen bekannte ziehende Reduktion schon öfters beobachtet werden konnte. Als im Blindversuch mit reiner Ascorbinsäurelösung kein Reduktionsvermögen mehr festzustellen war, waren diese anderen reduzierenden Stoffe immer noch auf den Farbstoff wirksam.

Zusammenfassung.

1. Es wurde festgestellt, daß die Bildung der Ascorbinsäure in Blättern der Birke, Walnuß und Johannisbeere in erster Linie von der Jahreszeit abhängig ist und von der Witterung nur insofern beeinflußt wird, als hierbei abnorme Temperaturwechsel von längerer Dauer auftreten. Es zeigte sich ferner, daß der Vitamin C-Gehalt der Birken- und Walnußblätter von dem der Johannisbeerblätter um nahezu das Doppelte übertroffen wurde.

2. Die Reaktion zwischen Silbernitrat und reiner Ascorbinsäure konnte quantitativ festgelegt werden und erwies sich als eine Zeitreaktion. Als Bestimmungsmethode von Vitamin C in pflanzlichen Produkten ist sie nicht brauchbar, da andere, in der Pflanze neben Ascorbinsäure in der Ueberzahl vorhandene reduzierende Stoffe ebenfalls Silbernitrat zu reduzieren vermögen.

3. Auf Grund dieser Beobachtung war es ferner erklärlich, daß eine Reindarstellung von Vitamin C aus Birkenblättern erfolglos bleiben mußte.

4. Ascorbinsäure, die in doppelt destilliertem Wasser gelöst wurde, zeigte im Gegensatz zur Lösung in einfach destilliertem Wasser eine hervorragende Haltbarkeit ihres Reduktionsvermögens. Trotz großer Berührungsfläche mit Luftsauerstoff waren z. B. nach 3wöchigem Stehen noch 50% ihres ursprünglichen Reduktionsvermögens nachzuweisen.

Weiter konnte in diesem Zusammenhang festgestellt werden, daß das Blattgewebe der Birke, welches 24 Stunden in Wasser gelegen hatte, eine schützende Wirkung auf das Reduktionsvermögen essigsaurer Blattauszüge auszuüben vermochte.

Es zeigte sich ferner, daß der Abfall des Reduktionsvermögens einer Ascorbinsäurelösung eine Zunahme ihrer Leitfähigkeit zur Folge hat, indem die oxydierte Ascorbinsäure schnell wandernde Wasserstoffionen bildet.

5. Die Wirksamkeit der Oxydasen erwies sich als abhängig von der Berührungsfläche der Fermentauszüge mit Luftsauerstoff. Die von A. Szent-Györgyi vertretene Ansicht, daß nicht die Oxydasen, sondern die von ihnen gebildeten primären Oxydationsprodukte vom Typus der o-Chinone auf Ascorbinsäure oxydierend einwirken, konnte bestätigt werden.

6. Endlich zeigte sich, daß der im Organismus beobachtete hemmende Einfluß der Vitamine A, D und der des B-Komplexes (aus Hefe) auf Vitamin C im Reagenzglas nicht in Erscheinung trat.

Schriftennachweis.

(1) J. Tillmans: Z. f. Untersuchung der Lebensmittel 54, 33; 1927. 60, 34; 1930.

(2) H. Henke: Inaug.-Dissert., Ffm. 1936.

(3) E. Gugath: Inaug.-Dissert., Ffm. 1937.

(4) A. Szent-Györgyi: Biochem. Zs. 162, 399; 1925.

(5) A. Szent-Györgyi: Biochem. Jl. 22, 1387; 1928.

(6) R. Chodat: Archives des Sciences physiques et naturelles 33, 79; 1912.

(7) A. Bach: B. 47, 2125; 1914.

(8) H. S. Raper: Fortschritte d. Enzymforschung, Bd. 1.

(9) H. Dick: Inaug.-Dissert., Ffm. 1932.

(10) Zusammenfassung dieser Arbeiten siehe: W. Stepp, J. Kühnau, H. Schröder „Die Vitamine und ihre klinische Anwendung", Stuttgart 1936, S. 128 ff.

Lebenslauf.

Am 16. November 1911 wurde ich, Willi Rudolph, als einziger Sohn des Kaufmanns Alfred Rudolph und seiner Ehefrau Therese zu Frankfurt a. M.-Höchst geboren. Nach vollendetem 6. Lebensjahre besuchte ich zunächst die Vorschule und dann die Oberrealschule zu Frankfurt a. M.-Höchst, an welcher ich Ostern 1931 das Zeugnis der Reife erhielt.

Im Chemischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt a. M. absolvierte ich anschließend mein gesamtes Chemiestudium. Meine Lehrer waren die Professoren J. v. Braun und R. Schwarz (anorganische Chemie), W. Borsche und G. Hahn (organische Chemie) und K. F. Bonhoeffer (physikalische Chemie).

Im Januar 1936 begann ich dann am Universitätsinstitut für Nahrungsmittelchemie in Frankfurt a. M. unter Leitung von Dr. R. Strohecker die vorliegende Arbeit.

Auf Anregung von
Herrn Dr. phil. habil. R. Strohecker,
des derzeitigen Leiters des Universitäts-Instituts für Nahrungsmittelchemie in Frankfurt a. M., wurde die vorliegende Arbeit begonnen und ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Dr. phil. habil. R. Strohecker, sowie seinem Mitarbeiter, Herrn Dr. R. Vaubel, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen für die wertvollen Ratschläge, die mir von ihrer Seite immer wieder bereitwilligst zuteil wurden, wie auch für das rege Interesse, welches sie jederzeit meiner Arbeit entgegenbrachten.